جامعة حلب

كلية الطب البشري

قسم الطب المخبري

شعبة الأحياء الدقيقة



تقييم الغلوبيولينات المناعية IgG , IgM للبروسيلا بطريقة المقايسة المناعية بالربط بالأنزيم (الإليزا) لتشخيص الحمى المالطية

بحث علمي أعد لنيل شهادة الدراسات العليا في اختصاص الأحياء الدقيقة

إعداد

د. حلا اسليم

1432 هـــ

2011 م

جامعة حلب

كلية الطب البشري

قسم الطب المخبري

شعبة الأحياء الدقيقة



تقييم الغلوبيولينات المناعية IgG , IgM للبروسيلا بطريقة المقايسة المناعية بالربط بالأنزيم (الإليزا) لتشخيص الحمى المالطية

Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis

بحث علمي أعد لنيل شهادة الدراسات العليا في اختصاص الأحياء الدقيقة

إعداد

د. حلا اسليم

إشراف

الدكتور شاكر الفارس

مدرّس في قسم الطب المخبري

كلية الطب – جامعة حلب

الدكتور عمـر بـلاش

أستاذ في قسم الطب المخبري

كلية الطب – جامعة حلب

جامعة حلب

كلية الطب البشري

قسم الطب المخبري

شعبة الأحياء الدقيقة



تقييم الغلوبيولينات المناعية IgG , IgM للبروسيلا بطريقة المقايسة المناعية بالربط بالأنزيم (الإليزا) لتشخيص الحمى المالطية

Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis

بحث علمي أعد لنيل شهادة الدراسات العليا في اختصاص الأحياء الدقيقة

إعداد

د. حلا اسليم

إشراف

الدكتور شاكر الفارس

مدرّس في قسم الطب المخبري

كلية الطب – جامعة حلب

الدكتور عمـر بـلاش

أستاذ في قسم الطب المخبري

كلية الطب – جامعة حلب

رسالة أعدت لنيل شهادة الدراسات العليا في اختصاص الأحياء الدقيقة في قسم الطب المخبري في كلية الطب بجامعة حلب

1432هـ

2010 م

شهادة

أشهد أن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث قامت به الدكتورة حلا اسليم طالبة الدراسات العليا في قسم الطب المخبري شعبة الأحياء الدقيقة – كلية الطب – جامعة حلب ، بإشراف الأستاذ الدكتور عمر بلاش الأستاذ في قسم الطب المخبري والمدرس الدكتور شاكر الفارس المدرس في قسم الطب المخبري ، كلية الطب – جامعة حلب، وأي رجوع إلى بحث آخر في هذا الموضوع هو موثق في النص .

المرشح		المشرفان على الرسالة
الدكتورة	**المدرس الدكتور**	**الأستاذ الدكتور**
حلا اسليم	**شاكر الفارس**	**عمر بلاش**

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (تقييم الغلوبيولينات المناعية IgG , IgM للبروسيلا بطريقة المقايسة المناعية بالربط بالأنزيم (الإليزا) لتشخيص الحمى المالطية) لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على أي شهادة أخرى .

المرشح

الدكتورة حلا اسليم

كلمة شكر

في آخر الطريق الدراسي وقبل انطلاقي إلى الحياة العملية ، لابد لي من وقفة أشكر فيها كل من كان له فضل علي في تعليمي – أساتذتي الكرام – و أخص بجزيل الشكر **الأستاذ الدكتور عمر بلاش** الذي تفضل مشكوراً بالإشراف على هذه الرسالة، كما أتقدم بجزيل الشكر **للمدرس الدكتور شاكر الفارس** الذي شارك في الإشراف على هذه الرسالة .

الدكتورة

حلا اسليم

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ   /   /   200م

عضو **عضو** **المشرفان على الرسالة**

المدرس الدكتور **الأستاذ الدكتور**

شاكر الفارس **عمر بلاش**

فهرس المحتويات

فهرس الجداول

فهرس الأشكال والمخططات

فهرس الأشكال

المقدمة

يُعَدّ داء البروسليات (Brucellosis) أو الحمّى المتموجة أكثر الأمراض الجرثومية المشتركة انتشاراً في العالم، خاصةً في دول الشرق الأوسط والخليج العربي، بينما يتراوح عدد الحـالات فـي الولايات المتحدة بين الـ 100حالة والــ200 حالةً سنوياً وذلك بسبب برنامج تلقيح الحيوانات المكثف، والمسح الروتيني للمواشي والحيوانات الداجنة، وتعقيم الحليب.(3)

ويُشكّلُ هذا المرض عبئاً صحياً واقتصادياً في البلاد التي تكثر فيهـا الإصـابات كالبلـدان النامية، حيث يقدر مجموع الحالات في العالم بحسب منظمة الصـحة العالميـة WHO بـ 500.000 حالة سنوياً، إلا أن واقع الإصابات أكثر من ذلك(3).

إنَّ أعراض هذا المرض ومظاهره متنوعةٌ وغير نوعيةٍ (خاصةً في المرحلـة المزمنـة) ، حيث يتم تمييزها سريرياً في أقل من 10% من الحالات في الإنسان، وهي نفس الحالات التـي يـتم علاجها وتسجيلها، ولذلك يتطلب التشخيص الدقيق طرقاً تشخيصيةً مخبريةً نوعيةً، كعـزل الجرثـوم والاختبارات المصلية، من أجل ضمان التشخيص الصحيح ومن ثَمَّ العلاج الصحيح لهـذا المـرض الإنتاني متعدد الأشكال(4).

وتتوافر تقنيات العزل التقليدية كالزرع من الدم ونقي العظم في البلاد النامية، ولكنها بطيئـةٌ جدّاً؛ ويتراوح معدَّل عزل البروسيلا في زرع الدم بين 47,1% و 94,1% وذلك بحسـب الطـرق المستخدمة ومدة الحضن، وهذا حدَّ من الاستخدام الروتيني لهذه التقنية في التشخيص. وقد أصـبحت معظم المخابر المتطورة حديثاً تستخدم تقنيات العزل السريعة مثـل (Bactec، PCR....وغيرهـا)، والتي لا تتوافر في معظم البلاد النامية. لذا يقوم التشخيص البديل في غياب العزل الجرثـومي علـى أساس ارتفاع عيار الأضداد النوعية(5،4).

وقد تطوّر عددٌ من الاختبارات المصلية لتشخيص المرض في الإنسان، حيث يُعَدّ التـراصّ في الأنبوب (SAT) الاختبار الأشيع استخداماً في العالم.

وقد أُدخلتْ الإليزا مؤخّراً إلى المخابر السريرية، حتى أصبحت الاختبار الأكثر مصداقيةً في كشف أنواع الغلوبيولينات المناعية، وخاصة في الحالات المزمنة والمختلطة، وصارت بذلك متفوقـة على الاختبارات المصلية الأخرى. وأظهر تقييم الإليزا في كشف الغلوبيولينات النوعية أنهـا أكثـر

حساسية ونوعية من الاختبارات التقليدية لقدرتها على التمييز بين الأضداد النوعيـــة المترافقـــة مـــع المرض الحاد والمزمن(5).

وثمّة إشكاليّةٌ في الطريقة الأكثر مُناسَبة لتشخيص الحمّى المتموّجة؛ إذ يشيع في المشافي والمخابر السورية استخدام اختبار التراصّ على شريحة ، في الوقت الذي تنحاز فيه بعض الدراسات إلى الإليزا. وبناء على ذلك سيناقش هذا البحث تلك الإشكالية، وهو يهدف إلى الآتي:

1- تحليل القيمة التشخيصية للمقايسة المناعية بالربط بـــالإنزيم (الإليـــزا IgG و IgM) فـــي مرضى مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموجة.

2- تحري العلاقة بين الإليزا IgG و IgM واختبار التراصّ على شريحة (باستخدام مستضدات البروسيلا المالطيةM والبروسيلا المجهضةA).

3- توظيف نتائج البحث في تشخيص المرض على نحو أفضل طبّيّاً، وأجدى نفعاً مادّيّـــاً، فـــي القطر العربي السوري.

الباب الأوّل

القسم النظري

الفصل الأوّل: البروسيلا بين التأريخ والتصنيف

الفصل الثاني: العامل المُمرض

الفصل الثالث: الوبائية ومستودعات الإنتان وطرق الانتقال إلى الإنسان

الفصل الرابع: الفيزيولوجيا المرضيّة وعوامل الخطر

الفصل الخامس: طيف المرض وأعراضه

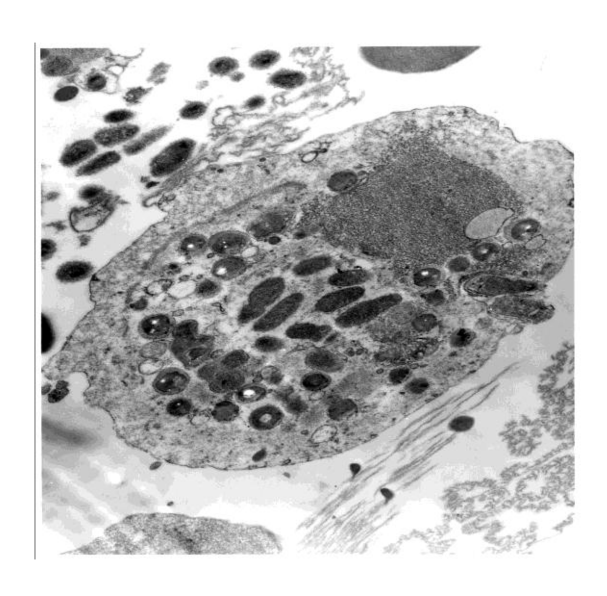
الفصل السادس: تشخيص داء البروسيليات

الفصل السابع: العلاج والوقاية

الفصل الثامن: بحوث في مجال الدراسة

الفصل الأوّل

البروسيلا بين التأريخ والتصنيف



1- توصيف عامّ: صُنِّفَ جنسُ البروسيلا ضمن فصيلة العصيات الصغيرة. و تتوضع هذه الجراثيم في الأعضاء التناسلية للحيوانات المضيفة مسببةً لها الإجهاض والعقم، كما تُطرَح بأعداد كبيرةٍ في بول الحيوانات وحليبها، إضافة إلى سوائل المشيمة والسوائل الأخرى لها، لذلك يُعَدُّ التعامل مع الحيوانات المخموجة أو تناول منتجاتها من أهم طرق العدوى بالبروسيلا عند الإنسان.**(2،1)**

وللبروسيلا ثلاثة أنواع رئيسية، هي: البروسيلا المالطية (الماعز والأغنام)، والبروسيلا المجهضة (الماشية)، والبروسيلا الخنزيرية (الخنازير). وقد اعتُقد سابقاً أنّ كلاًّ من هذه البروسيلات لا يصيب إلا الحيوان الذي اكتشفت عنده، ولكن تبيّن بعد زمنٍ أنّ هذه الجراثيم لا تختصّ بحيوان معين وأنّ البروسيلا بأنواعها يمكن أنْ تصيب الكثير من الحيوانات الأهلية والبرية مثل: الماعز والخراف والأبقار والخنازير والأيل والكلاب والأرانب والغزلان وغيرها. وتُعَدُّ هذه الحيوانات مستودعاً للجرثوم، وبذلك عرفنا أنّ داء البروسليات مرضٌ يصيب الحيوانات وينتقل للإنسان بشكل عرضي**(2،1)**.

2 الأدب الطبيّ: يعتقد أنّ داء البروسليات مرضٌ قديمٌ، إذ وُصِفَ منذ أكثر من 2000 عام من قبل الرومان. لكنَّ السير ديفد بروس Sir David Bruce هو أول من اكتشف العلاقة بين المتعضّية والمرض، إذ قام بعزل البروسيلا المالطية في جزيرة مالتا، في عام 1887 م**(11،6)**.

وفي عام 1897م قام الطبيب برنارد بانغ Bernhard Bang بعزل البروسيلا المجهضة من الماشية المجهضة في الدنمارك، وأصبح (داء بانغ) اسماً إضافياً للمرض، وفي العام نفسه قام Hughes ML بوصف موجودات المرض بتفصيل أكبر مؤكّداً على (الحمّى المتموجة) اسماً لهذا المرض. وفي عام 1905 استحق الطبيب مالتيز Zamit maltese لقب سير لأنّه أوّل من أثبت أنّ الحليب غير المعقم هو المصدر الرئيسي للبكتيريا، حيث عزل العضيّات من بول الماعز وحليبها، واستنتج أنّ الماعز مستودعٌ للبروسيلا المالطية. ومنذ ذلك الحين أصبحت الحمّى المالطية اسماً لهذا المرض(12،7،6).

ثمّ في عام 1914م عُزِلَتْ البروسيلا الخنزيرية في خنزير خديج ، في ولاية إنديانا في الولايات المتحدة الأمريكية، وفي العام ذاته قام العالم تراوم Traum بعزل البروسيلا الكلبية من كلاب مجهضة، وأثبت هاديلسون HUDDLESON تورطها في إصابة الانسان عام 1943(8،7).

وفي عام 1918 قامت أليس إيفانز Alice Evans وعلماء أمريكيون في مجال الأحياء الدقيقة، بنشر تقرير يؤكّد استحالة تمييز البروسيلا المالطية المعزولة من الماعز وسلبيات الغرام المعزولة من البقر، شكلياً أو بالزرع أو بالاختبارات الكيماوية الحيوية، ولكنها تختلف مستضدّياً عند استخدام اختبارات التراصّ، ولقد أكد ماير وشاد Mayer & Chad ملاحظات إيفانز، واقترحا (البروسيلا) اسماً لهذه الجرثومة كشرف للسير بروس(10،9).

وفي عام 1956 اكتشف بويس و بودل Buddle &Boyce نوعَ البروسيلا Ovis كمسبب لالتهاب البربخ في حيوان الكبش. وفي عام 1957 قام ستونر ولاك مان Stoner & Lakman بعزل نوع البروسيلا Neotoma من جرذ الخشب الصحراوي في يوتاه في الـ USA(13،7).

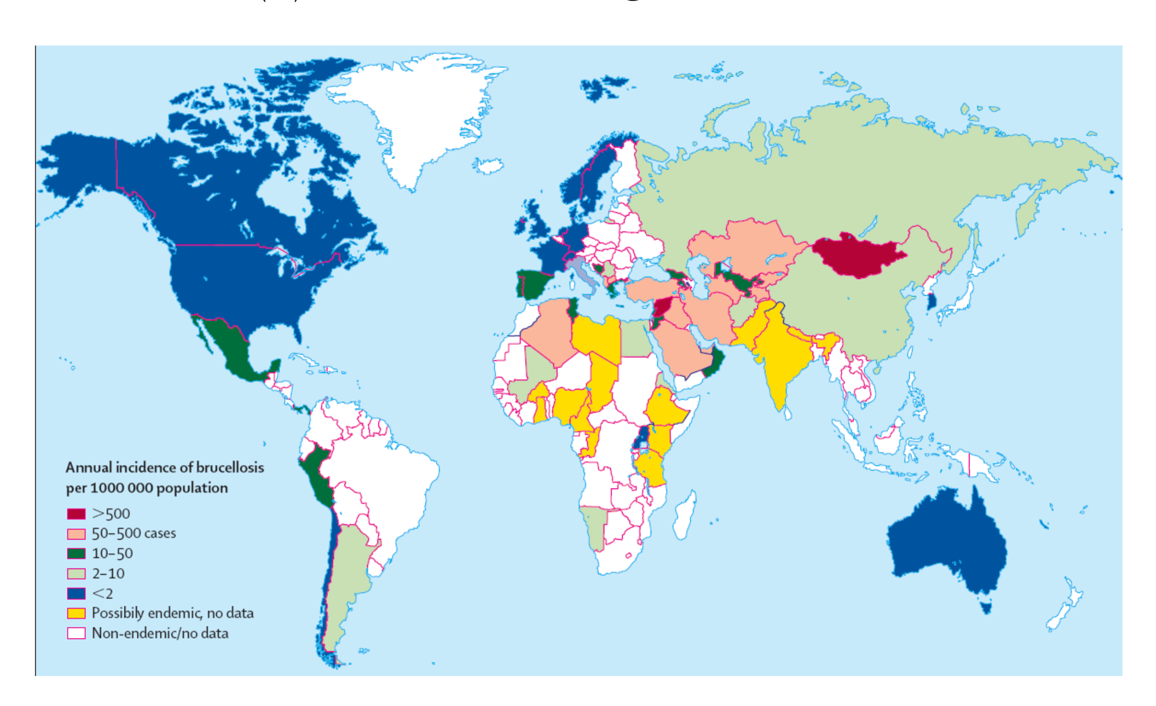
ثمّ في عام 1968 اكتشف كارمايكل وبورنر Carmichael & Borner نوعَ البروسيلا Canis، وتم تأكيد إصابتها للبشر بعد ذلك. وفي عام 1989م قام أطباء في مجال الأعصاب في المملكة العربية السعودية بتشخيص داء البروسليات العصبي.(14)

وفي عام 1994م عزل بعضُ العاملين الأمريكيين والبريطانيين بروسيلا غير معروفة من الدلافين في كاليفورنيا و من الفقم البحرية في اسكتلندا، وقد سميت البروسيلا Maris (15).

وقد استُبدِلَت (في القرن العشرين) جميع الأسماء التي أُطلِقَت على المرض في القرن التاسع عشر باسم(الحمّى المتموّجة) أو (داء البروسليات)(7،6) .

كما استخدمتْ البروسيلا في عام 1942 كسلاح حرب بيولوجي؛ حيث طُوّرت البروسيلا المالطية والمجهضة كأسلحة بيولوجية لأنها ثابتة وذات جرعة خامجة منخفضة في قطيرات الهواء. وفي عام 1954م أصبحت البروسيلا الخنزيرية ، أول عامل مرضي يتم استخدامه كسلاح حرب في ولاية أركانساس في الولايات المتحدة من قبل برنامج الأسلحة البيولوجية الهجومي الأمريكي **(13)**.

3-**الخريطة العالمية الجديدة للبروسيلا:** ارتقت وبائية البروسيلا خلال العقود الماضية بصورة هائلة، بسبب اختلاف الوضع الصحي والحالة الاقتصادية والاجتماعية، إضافة للوضع السياسي وتطور السفر عالميّاً، ممّا جعل بعض الدول التي كانت من المناطق الموبوءة، تحقّق السيطرةَ على المرض ومنها فرنسا، وأمريكا اللاتينية، بينما تخلّصتْ كلٌّ من السويد والنرويج والدنمرك ويوغسلافيا تماماً من المرض، وفي جانب آخر؛ فقد ظهرت بؤرٌ جديدة للمرض وخاصةً في وسط آسيا، حيث ساء الوضع بشكل سريع في بلدان معينة في الشرق الأوسط، مثل سوريّة، وهي التي تمتلك أعلى نسبة حدوث للمرض عالمياً؛ حيث سجّلت 1603 حالات / في المليون سنوياً تبعا لـ OIE، والتي ترى أنّ العدد الحقيقي للحالات هو ضعف ما يُسجّلُ في كلّ عامٍ، وأنّ أعلى حدوث للمرض عالميا هو في 5- 10 دول تابعة لمنطقة الشرق الأوسط،على رأسها سوريّة كما ذكر سابقاً**(16)**.



(http://infection.thelancet.com)

ومن المفيد للذكر أيضاً أنّ المرضَ ما يزال موجوداً في مناطق عديدة من أوروبا وأمريكا، ومن ثَمَّ نجد أنّ معرفة الخارطة الجديدة للمرض عند الإنسان ستسمح بتدخل عاجل وفعال لمنظمة

الصحة العالمية. والجدول التالي يوضح الحدوث العالمي لداء البروسليات في الإنسان في آسيا في كل مليون من عدد السكان(**16**):

البلد	**عدد الإصابات**
أفغانستان	3.8
أرمينيا	31.3
أذربيجان	52.6
الصين	8
الهند	لا يوجد معلومات متوفرة مع أنها بلد مستوطن محتمل
العراق	278.4
إيران	238.6
الأردن	9.2
كازاخستان	115.8
كوريا الجنوبية	1
الكويت	33.9
لبنان	49.5
منغوليا	605.9
عمان	35.6
باكستان	لا يوجد معلومات متوفرة مع أنها بلد مستوطن محتمل
السعودية	214.4
سورية	1603.4
تركيا	262.2
الإمارات العربية المتحدة	41
أزباكستان	18
تركمستان	51.5
كيرجستان	115.8
تاجيكستان	211.9

4-التصنيف: ما يزال تصنيف البروسيلا ناقصاً وغير واضح ، وهو يستند على تسلسل الجين 16SrRNA، كما عُدَّتْ البروسيلا a-2proteobacteria، ولهذا نُفِيَتْ أيّةُ علاقة بينها وبين الريكتسيا

التي تُعَدّ agrobacterium. **وقد** صُنِّفتْ البروسيلا على أساس الاختلاف في الإمراضية والمضيف النوعي لها إلى سبعة أنواع، وفي الحقيقة قام verger وزملاؤه باستخدام التهجين DNA-DNA للتحري عن 51 سلالة لجميع الأنواع، فوجدوها متماثلة تماماً، واستنتجوا أن جميع الأنواع يجب أنْ تُعدَّ تحت أنماط (biovars) للبروسيلا المالطية، ولقد رُفِضَ الاقتراح السابق بشكل واسع بسبب اختلاف المستودع الحيواني واختلاف شدّة المرض السريري بين الأنواع المختلفة**(17)**.

أمّا الخصائص التصنيفية لأنواع البروسيلا فهي مبيّنة في الجدول التالي**(18):**

الأنواع	تحت الأنماط	المضيف الطبيعي	إصابة الانسان
البروسيلا المجهضة	1−6 و 9	الماشية	نعم
البروسيلا المالطية	1−3	الماعز و الأغنام	نعم
البروسيلا الخنزيرية	1و3	الخنزير	نعم
	2	الأرانب البرية	نعم
	4	الرنة و الوعل	نعم
	5	القوارض	نعم
البروسيلا الكلبية	لا يوجد	الكلاب بأنواعها	نعم
B.Ovis	لا يوجد	الأغنام	لا
B.Neotomae	لا يوجد	جرذ خشب الصحراء	لا
B.Maris		الثدييات البحرية	؟

الفصل الثاني

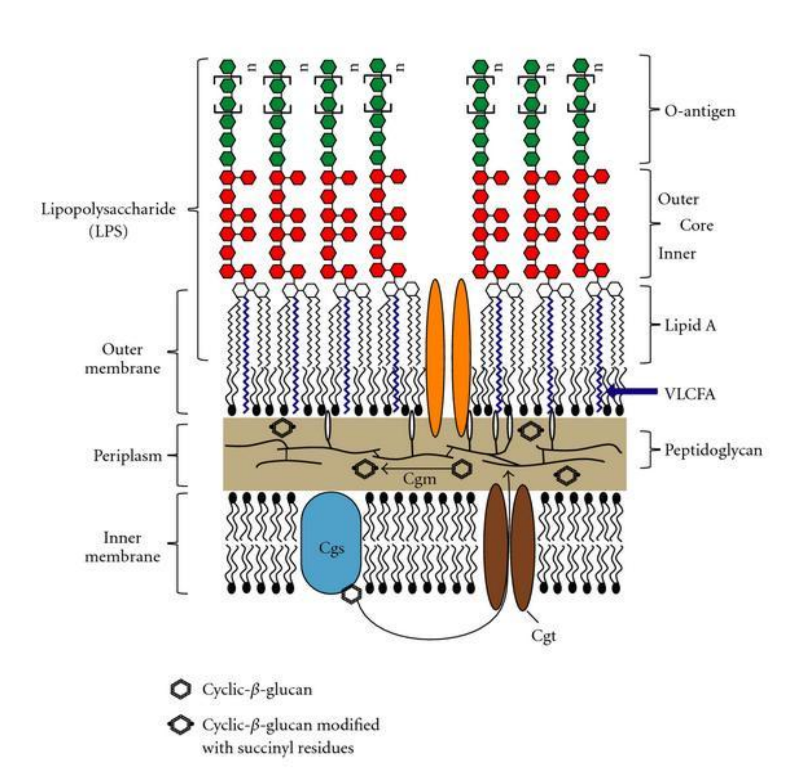
العامل المُمْرِض

1-غلاف العامل الممرض: يتألّف غلاف خلية البروسيلا من الآتي:

1. غشاء داخليّ، يتكوّن من طبقتين من الفوسفوليبيدات.
2. غشاء خارجيّ، يتكون من طبقتين: داخليّة وخارجيّة، تتكون الطبقةُ الداخلية من الفوسفوليبيدات والطبقةُ الخارجيّة من عديدات السكريد الشحمية LPS .

ويتألف الـ LPS من ثلاثة مكونات، هي :

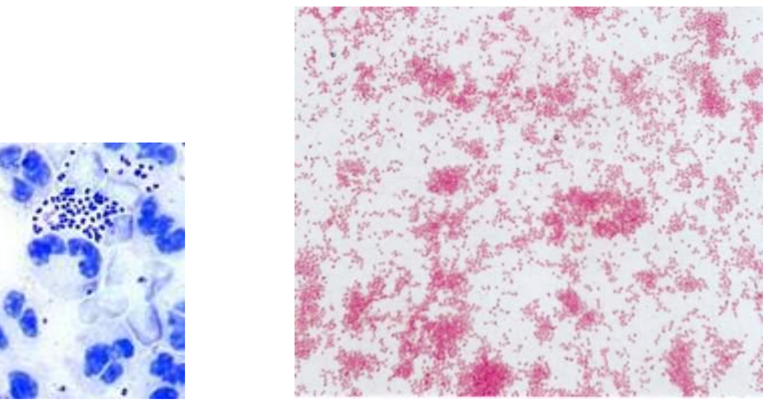
1. الـ O antigen : يشكل الحيز خارج الخلوي المحرض للاستجابة المناعية.
2. جزيء لب السكر (core) المؤلف من سكاكر مختلفة لم يتم تحديدها حتى الآن.
3. الليبيد A : يشكل القاعدة الثابتة الماصة للماء بالنسبة للـ LPS ضمن الغشاء الخارجي.

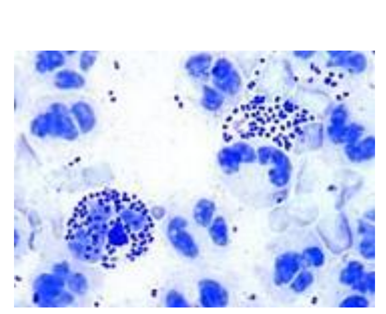


ويحتوي الليبيد A على سلسلة طويلة جدّاً ومميزة من الحموض الدسمة (VLCFA). ويُصنَّعُ الـ Cyclic-B-glucan من قبل بروتين الغشاء الداخلي Cgs ثم ينتقل إلى الطبقة السكرية الشحمية

Periplasmic عن طريق الناقل Cgt، ليتم تعديل الـ Cyclic-B-glucan عن طريق بروتين الغشاء Cgm مع ثمالة السوكسينيل.

2-شكل البروسيلا وزرعها: البروسيلا عصيّة مكوّرة ذات أبعاد صغيرة 0,5 -1,5 مكم وعرض 0,5 مكم ، سلبية الغرام داخل خلوية مخيرة، مقاومة للحمض جزئياً، غير متحركة ، غير متبوغة، عديمة المحفظة، إضافة إلى أنها هوائية مجبرة، وبعض الأنواع كالمجهضة تحتاج إضافة CO_2 بنسبة 10% من أجل العزل الأولي، وهي تنمو بصعوبة على المنابت العادية، ولزرعها في المخبر يتم استخدام وسط الببتون عالي النوعية مضافاً إليه المصل أو الدم (هناك الغراء المضاف له 5% من دم الخروف أو الغراء بالتريبتوز أو الغراء بالتريبتيكاز أو الصويا، أما المستنبتات السائلة فيفضل مستنبت مرق الكبد أو المرق بالتريبتوز أو المرق بالتريبتيكاز والصويا). وتنمو هذه الجراثيم بحرارة 37 درجة مئوية ودرجة PH تعادل 6,8**(1)**.





3-الصفات الكيميائية الحيوية:جميع سلالات البروسيلا إيجابية الكاتالاز، والأكسيداز واليورياز، وجميعها تطلق غاز كبريت الهيدروجين بكميات كبيرة أو قليلة حسب النوع، ولا تميع الهلام، ولا تحرر الإندول، وهي تفكك الغلوكوز بالأكسدة دون إطلاق الغاز أو تحرير الحموض، وترجع النترات إلى نتريت**(1)**.

كما يمكن استخدام بعض الملونات للتمييز بين الأنواع الرئيسية للبروسيلا وذلك عن طريق التثبيط الانتقائي للنمو في المستنبتات الصلبة الحاوية على أصبغة كالثيونين و الفوكسين**(1)**.

والجدول التالي يبين بعض الفروق الهامة للأنواع الثلاثة الرئيسية للبروسيلا**(1)**:

البروسيلا	الحاجة لـ CO2%10	إطلاق غاز H2S	النمو على مستنبت مضاف له	
			الفوكسين1/50000	الثيونين1/25000
البروسيلا المالطية	–	–	+	–
البروسيلا المجهضة	+	++	+	–
البروسيلا الخنزيرية	–	+	–	+

4-الصفات الحيوية: هذه الجراثيم ذات حيوية كبيرة في المزارع حيث تقاوم عدّة أشهر. وتعتمد مقاومتها للبيئة على درجة الحرارة، درجة الباهاء، الرطوبة، ومع ذلك فهي حساسةٌ للحرارة (تموت خلال 10 دقائق بدرجة 60 درجة مئوية) و من ثمّ فإن بسترة الحليب كافية للقضاء عليها ، كما أنها حساسة للمطهرات، وتقاوم بشكل كبير عندما يتم تجميدها أو حفظها في الأجنة المجهضة أو المشيمات.

وهذه البروسيلات لاتصطنع ذيفاناً خارجياً، ولكنها تصطنع ذيفاناً داخلياً مرتبطاً بالخلية الجرثومية، ويمكن أن نحصل من رشاحة المزارع الهرمة للبروسيلات على مواد كالبروسيلين، نستخدمها في التفاعلات الجلدية للبحث عن فرط التحسس المتأخر عند الأشخاص المشتبه بإصابتهم بداء البروسليات(1).

والجدول التالي يوضح مقاومة البروسيلا في الوسط(43):

الوسط (MEDIUM)	مدة البقاء على قيد الحياة (SURVIVAL)
التسخين إلى الحرارة 60 درجة مئوية	10 دقائق
الفينول 1%	لمدة 15 دقيقة
أشعة الشمس المباشرة	ساعات قليلة
الحليب	عدة أيام

الجبن الطري النيّء	3 أشهر
ماء الصنبور	57 يوم
بول الإنسان	أسبوع واحد
الغبار	6 أسابيع
التربة الرطبة (أقل من 10 درجات مئوية)	يوم واحد
التربة الجافة (تقريبا 20 درجة مئوية)	66 يوماً
سماد الحيوان في الصيف	53 يوماً
سماد الحيوان في الشتاء	7 أسابيع
براز الحيوان	100 يوم

5-البنية المستضدية: تمَّ تمييز عدد ضخم من المكونات المستضدية للبروسيلا، وإن المستضد المسيطر على استجابة الأضداد هو عديد السكريد الشحمي (LPS) الموجود في الجدار الخلوي.

والسلالات الخشنة R-LPS تشبه السلالات الملساء S-LPS وتختلف عنها في السلسلة O، والتي تكون إما غائبة أو ناقصة في الـ R-LPS، كما يحتوي الـ S-LPS على المستضدات M وA (19).

ويحدث التفاعل المتصالب بشكل شديد بين الأنواع الملساء للبروسيلا ويرسينيا التهاب الأمعاء والقولون O:9 ، والإشريكيا هيرمانيس، والإشريكيا كوليO:157، والسالمونيلا O:30 والستيروتروفوموناس مالتوفيلا، وهيضة الكوليرا O:1، وذلك في اختبارات التراصّ وتثبيت المتممة والسبب في ذلك هو التشابه في السلسلة الجانبية النوعية O للجزيء LPS(19).

إنّ الإصابة بالبروسيلا تولّد أضداداً راصةً وأضداداً مثبّتةً للمتممة في مصل المصاب، وكذلك تؤدّي الإصابة بأحد أنواع البروسيلا إلى حدوث تفاعلات متصالبة مع الأنواع الأخرى.

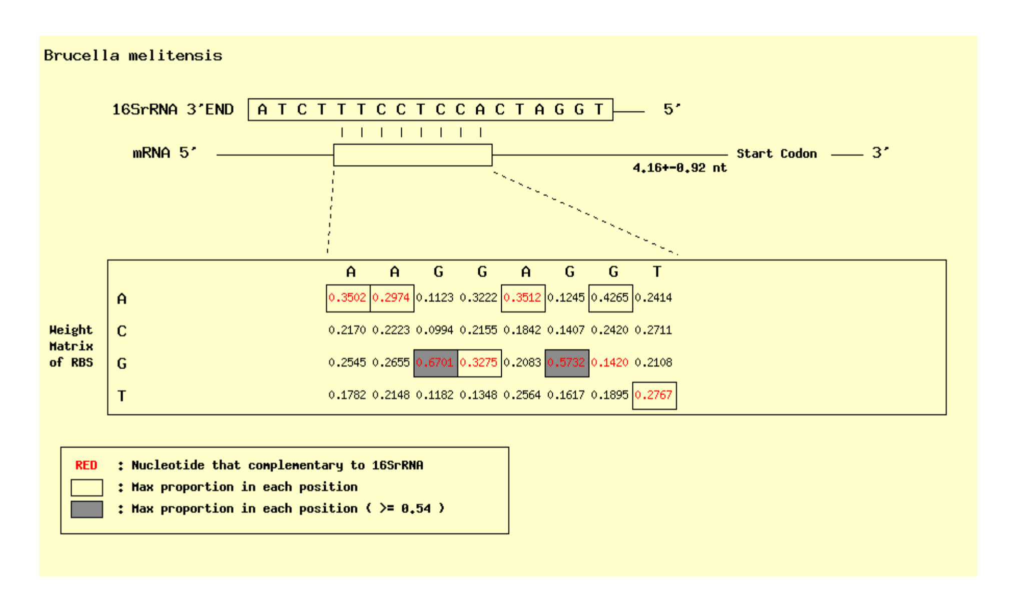
يشكل الـ Omp25 التركيب البروتيني للغشاء الخارجي للبروسيلا، الذي يحفظ بشكل كبير جميع أنواع البروسيلا، ويترافق مع الـــ LPS والببتيدوغليكان، ولقد ظهر حديثاً أنّ البروتينات الريبوزومية مكونات مناعية هامة، تحمي الجسم من الإنتان بالبروسيلا بمساعدة الأضداد والمناعة المتواسطة بالخلايا، ومثال لهذه البروتينات **L7/L12**. وينتج عن فرط التحسس المتأخر كلٌّ من البروسيللين وبروتينات الدمج المحرّضة للاستجابة الوقائية(20،21).

6-الجينوم: تم التعرف إلى التسلسل الكامل لجينوم البروسيلا المالطية والمجهضة والخنزيرية في السنوات الأولى لهذا العقد، وتعدّ البروسيلا المالطية 16M (biovar1) أول أنواع البروسيلا التي تمّ التعرف إلى تسلسلها الجيني، ثم تلاها التعرّف إلى البروسيلا الخنزيرية1330 (biovar1)**(23،22)**.

يتشابه تسلسل الجينوم لجميع أنواع البروسيلا من حيث التركيب الأساسي والحجم، ويحتوي الجينوم على صبغيين حلقيين، وتختلف في ذلك البروسيلا الخنزيرية biovar3 التي يحتوي الجينوم الخاص بها على صبغي واحد فقط.

يشكل التسلسل GC 57% من نكليوتيدات الجينوم، كما يحدد الجين Omp2 الحساسية للصباغ، وهي الخاصية التي استخدمت كأساس للتصنيف الوراثي الجيني للبروسيلا حتى ضمن الأنواع(**24،25،26**).

ما يزال التصنيف الجيني للبروسيلا صعباً جداً لأنّ الجينات المستخدمة في التصنيف المتعلق بتطور السلالة (phylogenetic) متشابهةٌ جداً، لكي تعطي أي نتائج ذات معنى. ولأنّ هذه الجينات_ و مثال عنها MLST و 16SrRNA _لا تعكس بشكل مباشر التغيرات في محتوى الجين**(26)**.



الفصل الثالث

الوبائية ومستودعات الإنتان وطرق الانتقال إلى الإنسان

1–الوبائية : تتغير وبائية البروسيلا من وقت لآخر. فالطيف الواسع للمضيفين ومقاومة البروسيلا للبيئة، وكذلك مناعة المضيف سهّل بقاؤها، حيث تبقى المصدر الرئيسي للمرض في الإنسان والحيوانات الأهلية على حدّ سواء، كما أنها تشيع في غرب آسيا و الهند والشرق الأوسط وجنوب أوربا وأمريكا الجنوبية. وتتميز البروسيلا بوجودها في المجتمعات الزراعية، خاصة تلك التي يعيش فيها الناس بالقرب من الحيوانات.

تم تسجيل معدل الحدوث العالمي للبروسيلا في المناطق الموبوءة بـ 1,2 – 70 في كل 100,000 من تعداد السكان، وكان عدد الحالات المسجلة في كلّ من مصر وإيران وعُمان والأردن و شبه الجزيرة العربية وسوريّة أكثر من 90,000 حالة في عام 1990، ويبقى العدد الحقيقي للإصابات غير معروف وقد يكون أكثر بـ 25 مرةً مما هو مسجل بسبب الافتقار للتشخيص الصحيح وللإحصاءات الدقيقة، كما تم تسجيل ارتفاع معّدل الحدوث في المناطق التي تستوطن فيها البروسيلا المالطية(**28،27**).

تتنوَّعُ معدَّلات انتشار المرض بشكل واسع بين القارات بسبب تَنوُّع التقارير، ولقد عادت الحالة الطارئة للمرض في مالتا و عُمان مؤخراً بسبب الفشل في القضاء على الإنتان(**29**).

يعتمد انتقال البروسيلا في منطقةٍ ما على عادات الطعام، وطرق معالجة الحليب ومنتجات الألبان، وعلى عادات المجتمع والزواج وعلى الظروف المناخية و الوضع الاقتصادي والاجتماعي وعلى العناية بنظافة البيئة الطبيعية وتصريف المجاري، إضافةً إلى الحفاظ على الصحة العامة التي يُعَدّ إهمالها عاملاً رئيسيّاً في الانتقال عبر قطيرات الهواء(**30**).

2–مستودعات الإنتان: إنّ داء البروسليات مرضٌ حيواني في الأصل، ويصاب به الإنسان غالباً نتيجة العدوى من الحيوانات الأهلية المصابة(**1**).

وتُعَد المستودعات الحيوانية لهذا المرض هي المصادرُ الرئيسية للغذاء عند الإنسان.

وحديثاً كُشف المرض في الثدييات البحرية، وهذا يسبب الخطر المهني لكلّ من يتعامل مع النسج المخموجة لهذه الحيوانات.

وتُعَدّ المالطية أكثر أنواع البروسيلا المعزولة من الإنسان، والبروسيلا الأشد فوعةً، والأكثر إحداثاً للمرض الحادّ في الإنسان أيضاً.

تستوطن البروسيلا المالطية بلاداً عديدةً، وتعدّ الخراف والماعز ومنتجاتها المصدر الأساسي للمرض في الإنسان (رغم تواجدها في حيوانات أخرى كالكلاب والماشية والجمال).

وقد سَبّب ظهور البروسيلا المالطية في الماشية وخاصة الأبقار مشكلة هامةً في دول كالكويت والسعودية، وفي بعض بلاد جنوب أوربا وكذلك في البرازيل وكولومبيا. ومن الجدير بالذكر أيضاً تفشي البروسيلا الخنزيرية biovar1 في الماشية أيضاً(23).

تُشكّل البروسيلا المالطية السبب الرئيسي للمرض في العالم، لأنّ اللقاح المستخدم لوقاية الماشية من الإصابة بالبروسيلا المجهضة لا يقي بشكل فعال من الإصابة بالبروسيلا المالطية، ولأنّ لقاح المالطية Rev1 لم يتم تقييمه بشكل نهائي للاستخدام في المواشي.

وتترافق البروسيلا المجهضة مع مرض خفيف الشدّة بالمقارنة مع البروسيلا المالطية والخنزيرية، وتُعَدّ الماشية أكثر المصادر للإصابة بالبروسيلا المجهضة (رغم وجودها في حيوانات أخرى كالجواميس والجمال والكلاب وغيرها).

تختلف مصادر البروسيلات وفوعتها باختلاف الـ biovar(22).

يتواجد الـ biovar 1 و2 و3 في الخنازير، ويتواجد الـ biovar2 في الأرانب أيضاً.

يسبب الـ biovar2 مرضاً خفيفاً في الإنسان، بينما يسبب الـ biovar1 و3 مرضاً شـــديداً عنده، ويقلّ تواتر الـ biovar4 في الإنسان، ليزداد في حيوانات الوعل والرنة في آلاسكا.

لم يتم تسجيل أي حالة مكتسبة طبيعية للـ biovar5، و حدوث البروسيلا الكلبية يكون متوسطاً في الإنسان، شائعاً في الكلاب حول العالم.

هذا، وتُعَدّ الحيوانات البرّية مصدراً نادراً للمرض في الإنسان، على الرغم من حدوث المرض في العديد من أنواعها.

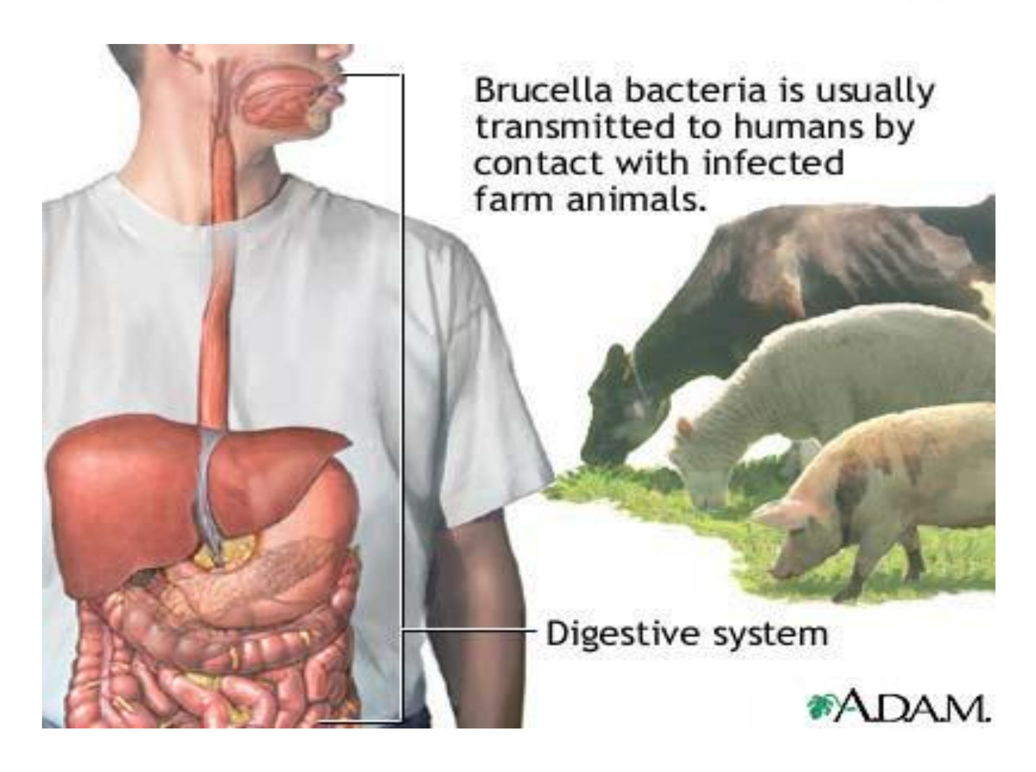
كما يُعَدّ مسح أفراد الأسرة خطوةً وبائيةً مهمةً، وخاصةً في الحالات غير المميزة سريرياً، وذلك لضمان التشخيص الصحيح. والعلاج الفعّال في الوقت المناسب،، ولتحقيق انخفاض الإمراضية morbidity (32،31).

إنّ عزل سلالات جديدة من الثدييات البحرية_ وكذلك من الإنسان_ وسّع المجال البيئي للمرض، واقترح إمكانية ظهور سلالات جديدة أخرى من البروسيلا ذات قدرة على التكيف مع المجتمعات المتغيرة ومع الإجراءات الزراعية(33،34).

3-الانتقال إلى الإنسان: يعدّ انتقال البروسيلا من إنسان إلى آخر نادراً جدّاً، وتتضمن الحالات التي تم تسجيلها الآتي: الاتصال الجنسي، وحليب الأم، ونقل الدم، وزرع الأعضاء وخاصة نقي العظم(35،36،37).

إن انتقال المرض للمشرفين على مرضى الحمّى المتموجة غير مطروق، ولكن اتخاذ الاحتياطات ضروري.

يُعَدّ استهلاك منتجات الحيوانات المخموجة كالحليب واللحم هو الأكثر أهمية وتأثيراً في انتقال المرض، على الرغم من الاعتقاد السابق بأن التماس المباشر مع الحيوانات المصابة هو أهم طرق الانتقال(38).



تحتوي منتجات الألبان المحضرة من الحليب غير المعقّم كالجبنة الطرية واللبن (yoghurts)_ وكذلك المثلجات_ تركيزاً مرتفعاً من الجراثيم، ويعد استهلاك هذه الأغذية الملوّثة

سبباً مهمّاً للمرض والطريق الأشيع لانتقال البروسيلا المالطية والمجهضة في السكان عامة والمشرق العربي خاصةً كما يمثل حليب الجمل مصدراً مهمّاً للإنتان في بلاد الشرق الأوسط و منغوليا(38).

تصيب البروسيلا الأعضاء المنتجة للحيوان فتسبب إجهاض الإناث والتهاب الخصية عند الذكور، وتقوم هذه الحيوانات بطرح البروسيلا في بولها وحليبها على الرغم من غياب الأعراض الدالة على المرض عندها في معظم الحالات(1).

وقد تكون المياه الملوثة بمفرزات الحيوانات المخموجة كالآبار والمياه الجارية مصدراً للمرض في الإنسان.

تتضمن طرق الانتقال الأخرى تلوث الجروح الجلدية و الأغشية المخاطية كالملتحمة، إضافة إلى استنشاق جزيئات السماد الحيواني والتربة الملوثة. وهذه الحالات مرتبطة ببعض المهن التي يُعَدّ أصحابها من ذوي الخطورة العالية وهم: (ملاك المواشي، والأطباء البيطريون، والرعاة، والصيادون، وعمال المسالخ و اللحوم، والمخبريون، وكذلك العائلات التي تتشارك والحيوانات في السّكن)(43،42).

تُعَدّ وخزات إبر اللقاح (خاصة السلالة 19 للبروسيلا المجهضة) واستنشاق العامل الممرض إضافة إلى تلوث ملتحمة العين والتعامل مع مزارع البروسيلا عالية الفوعة أو ضعيفتها مجازفةً صحيةً كبيرةً للعاملين في المخابر، ولذلك عُدّ هذا المرض أحد الإنتانات الشائعة المنتقلة في المخبر، وتم تسجيل حالات عديدة عند الأطباء السريريين والبيطريين و الباحثين والعاملين في مخابر الإنتاج، وهذا الانتقال هو الأشيع في البلدان الصناعية(39،40،41).

يُعَدّ الإرهاب البيولوجي أحد الطرق النادرة لانتقال المرض، ويكون التأثير أعظمياً في البلاد التي لا يستوطن فيها المرض(43).

أصبح تشخيص البروسيلا في الدول التي لا تشيع فيها تحدياً كبيراً بسبب ازدياد السفر والرحلات للمناطق الموبوءة، وتناول المسافرين للحليب غير المعقم أو لمنتجات الألبان الأخرى، كما أنّ إحضار الأجبان الملوثة مع المسافرين القادمين من البلاد الموبوءة يعرّضهم وعائلاتهم للمرض، وهذا يعلل كثرة المرض الحاد في أمريكا الجنوبية وأوربا الجنوبية(43).

لكن ثمة نقاطٌ مفتاحية للوبائية في داء البروسليات عند الإنسان وهي(43):

1. تبقى الماشية و الخراف و الماعز والخنازير مخازن البروسيلا الرئيسية.

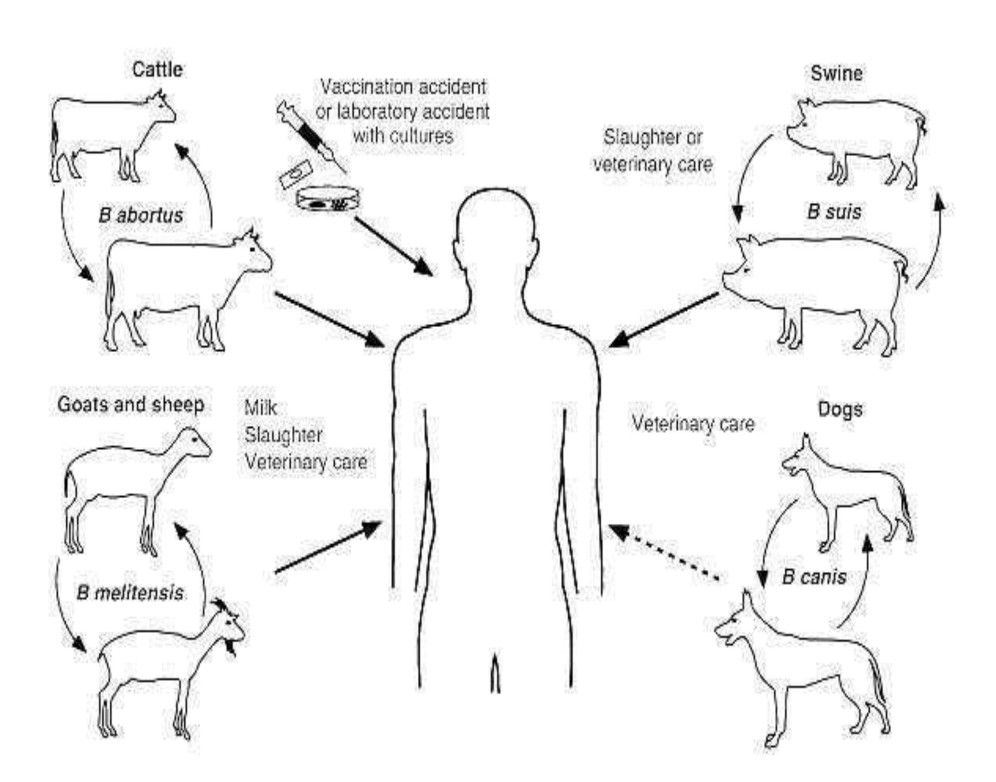
2. يحدث الانتقال إلى لإنسان عن طريق التعامل المهني أو البيئي مع الحيوانات المخموجة أو منتجاتها.

3. الانتقال عن طريق الغذاء هو المصدر الرئيسي للإنتان، وذلك عبر تناول الجبن المصنّع من الحليب غير المغلي. وشرب الحليب غير المعقم الذي يحمل خطراً مرتفعاً.

4. قد يترافق المرض بقصة سفر للمناطق الموبوءة بالبروسيلا.

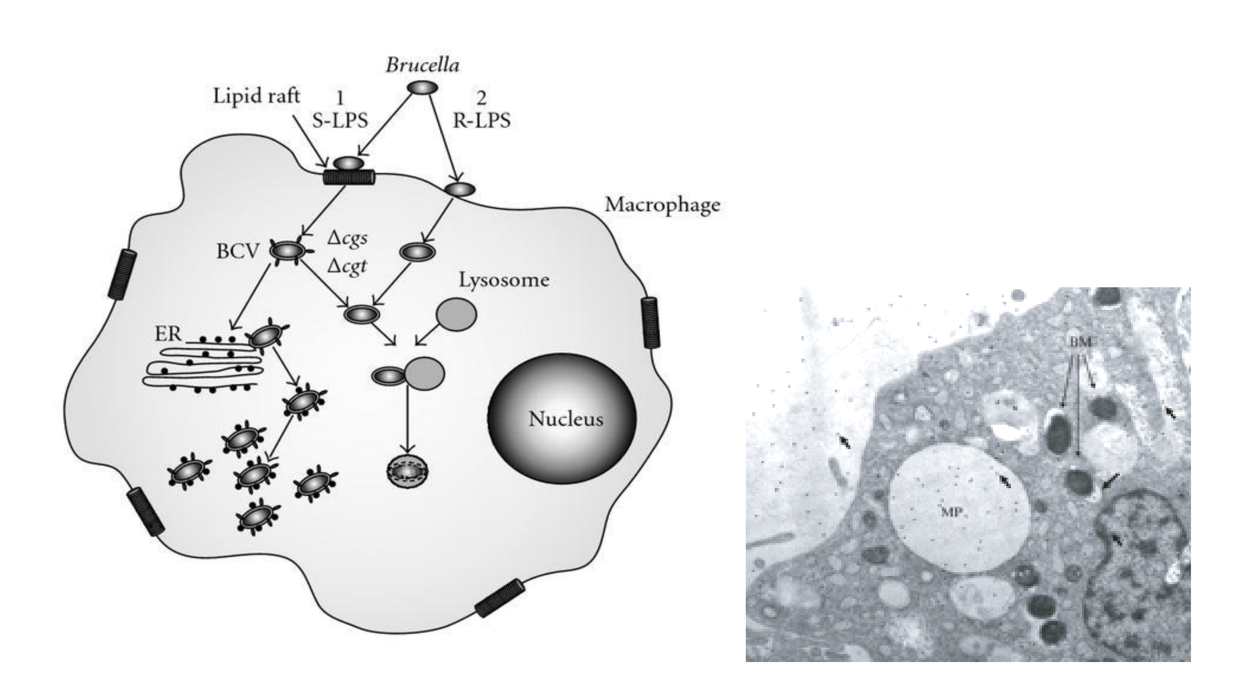
5. يعد نقل الدم و زرع الأعضاء مصدرين محتملين للبروسيلا.

6. إن الانتقال من شخص إلى آخر نادر جداً.



الفصل الرابع

الفيزيولوجيا المرضيّة وعوامل الخطر



1- **استهداف ونجاة البروسلا:** إنّ للبالعات الأفضلية في خمج البروسيلا. حيث تدخل سلالات البروسيلا الملساء S-LPS إلى البالعات من خلال التفاعل بينها وبين ما يسمى عوّامات الليبيد (lipid rafts)، ثم يتمّ جمعها في حيز مرتبط بالغشاء، يدعى الفجوة الحاوية على البروسيلا (BCV)، التي تثبت العلامات (markers) الخاصة بعوامات الليبيد، ليتم استهدافها بعد ذلك من قبل الشبكة السيتوبلاسمية الداخلية ER، ثم تندمج البروسيلا مع الــ ER مكتسبةً الــعلامات (markers) الخاصة بالــ ER ومن ثَمَّ تتجنب الاندماج مع الليزوزوم قبل عملية التضاعف.

لا تدخل البروسيلا R-LPS البالعات من خلال عوّامات الليبيد، ويتم استهدافها سريعاً من قبل الليزوزوم ليتم قتلها.

2-عوامل الفوعة: تتعلق الإمراضية في الإنسان بعدة عوامل، ويُعَدّ الـ S-LPS المحدد الأساسي للفوعة والمسيطر في استجابة الأضداد، و هو العامل الأساسي الذي يؤمن الحماية غير الكاملة قصيرة الأمد ضد الإنتان(**44**).

يعتمد تثبيط فوعة البروسيلا على البالعات المُفَعَّلة ومن ثَمَّ على تفعيل الخلايا التائية المساعدة النمط1 (TH1) التي تُعَدّ العنصر الرئيسي في المناعة المعتمدة على الخلايا، مترافقة مع فرط التحسس المتأخر.

يُعَدّ الـ LPS في البروسيلا مولداً ضعيفاً للحمى ومن ثَمَّ يعدّ محفزاً ضعيفاً نسبياً للسيتوكينات الالتهابية كالإنترفيرون غاما والعامل المنخر للورم TNFa الضروريان للقضاء عليها، ولكن الـ LPS يحفز وبشكل غير معتاد الـ IL12 الذي يحرض التائيات المساعدة النمط 1 (TH1)، ويرتبط إلى حد كبير بإنتاج الإنترفيرون غاما(46،45).

تتميز البروسيلا بفوعة وسمية منخفضة، كما أنها لا تنشّط جهاز المتمّمة البديل . ومن عوامل الفوعة المهمّة أيضا:

1- إنتاج مثبطات للأنزيمات الحالة الضرورية لعملية القتل و التدرك التي تحدث ضمن الجسيم البلعمي المسمى هنا phagolysosome، ومن هذه المثبطات الأدنين والغوانين أحادي الفوسفات(47).

2- يسبب بروتين الغشاء الخارجي25 (Omp25) الذي ينظم العامل المنخر للورم وخاصة في المرحلة الباكرة للإنتان، تعطيل الوظيفة المفعلة والسامة للقاتلات الطبيعية NK(48).

3- إن اختلاف الأنماط الظاهرية والمضيف الطبيعي لأنواع البروسيلا يعود لتنوع المستقبلات البروتينية للغشاء الخارجي للبروسيلا (49).

4- تنجو البروسيلا ضمن البالعات بفضل اصطناعها للبروتينات المحرضة للجهد مختلفة الوزن الجزيئي(49).

5-كما يحرض البروتين KDa24 على انخفاض حموضة الوسط PH<4 وهذه الحموضة مسؤولة عن مقاومة الصادات والحد من فعاليتها، وتشرح التضارب والاختلاف بين النتائج داخل الجسم وخارجه(50).

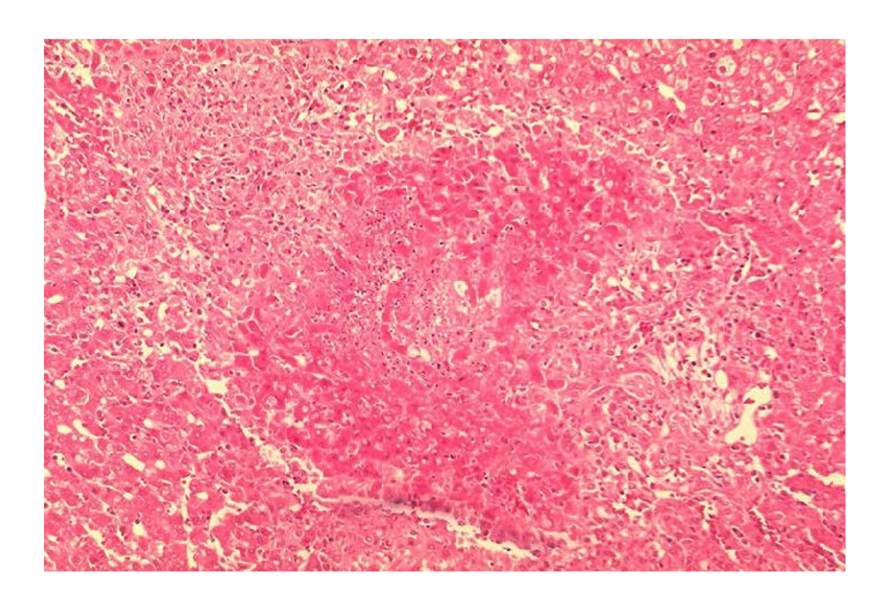
6- تم حديثاً تحديد أنزيم اليورياز كعامل فوعة مهمّ يحمي البروسيلا عند مرورها عبر المعدة في الانتقال الفموي لها، والذي يُعَدّ الطريق الأساسي للانتقال عند الإنسان(50).

تلعب كل العوامل السابقة على الأرجح دوراً في النجاة داخل الخلوية بالنسبة لـ 15 – 30% على الأقل من البروسيلا التي تدخل إلى الجسم على اختلاف طرق دخولها (بالابتلاع أو الاستنشاق أو عبر الملتحمة و تقرحات الجلد).

وقد اكتشف علماء في مؤسسة كارنيجي الأمريكية وجود جزيئات ذات حساسية للضوء في البروسيلا المالطية والمجهضة، وهذه الجزيئات تشبه تلك التي في النباتات والتي تسمى phototropins، وتتشارك هذه البروسيلات مع النباتات في سلسلة من البروتينات تسمى LOV وهذه السلسلة قادرة على اكتشاف الضوء والأكسجين، وتنخفض قدرة البروسيلا على إحداث المرض (الفوعة) بنسبة 10% عند تعطيل سلسلة LOV فيها، مما يؤكد بالفعل حاجة البروسيلا لضوء الشمس لكي تزيد من فوعتها.

3–توضع البروسيلا وحدوث المرض: ينتقل الجرثوم من مكان الدخول لتتم بلعمته ضمن الجسيم البلعمي للبالعات والخلايا البيضاء متعددة الأنوية، وبمقاومته للبلعمة ينتقل ضمن البالعات إلى العقد اللمفية الناحية حتى يتكاثر موضعياً فيها، وهذه المرحلة تمثل زمن الحضانة التي تمتد وسطياً من أسبوع حتى ثلاثة أسابيع وقد تصل لـ 90 يوماً أو حتى أشهراً، ثم يتجه الجرثوم إلى الدوران مسبباً إنتاناً دموياً ومشكلاً بؤراً ثانويةً، وتظهر العلامات السريرية المتنوعة إضافة إلى إصابة مجموعات عقدية أخرى[1].

تفضل البروسيلا التوضع في الأعضاء الغنية بالخلايا الشبكية البطانية كالكبد والطحال ونقي العظم، محدثةً فيها تشكلات حبيبومية و خراجات، تتكاثر فيها هذه الجراثيم، ولما كانت البروسيلا داخل خلوية فإنها تبقى حيةً ومحميةً من الأضداد وتأثير الصادات، وهذا ما يفسر جزئياً صفة إزمان المرض ونكسه، ومن ثَمَّ نجد أنّ الاستجابة المناعية لجسم الإنسان ضد البروسيلا هي التي تحدث المرض بما تسببه من خراجات و حبيبومات[1].



(Image:http://upload.wikimedia.org/Brucella_granuloma.jpg)

بالنتيجة تمتلك البروسيلا قدرة فريدة على مهاجمة الخلايا البالغة وغير البالغة، و تنجو 15 – 30 % من البروسيلات ضمن البالعات، وتستخدم العديد من الآليات لتتجنب وتخمد الاستجابة القاتلة للبكتيريا، ويعتمد ذلك على نوع الحيوان المضيف (LPS-S في المالطية والمجهضة والخنزيرية و LPS-R في الكلبية). وهذا يشرح تسبب البروسيلا بمرض جهازي يصيب أي عضو في الجسم.

ويختلف تأثر البروسيلا بالقتل داخل الخلوي باختلاف الأنواع فالبروسيلا المجهضة يتم قتلها بسهولة، أما البروسيلا المالطية فنادراً ما تتأثر، وهذا يشرح اختلاف الإمراضية والخصائص السريرية للمرض(43).

الفصل الخامس

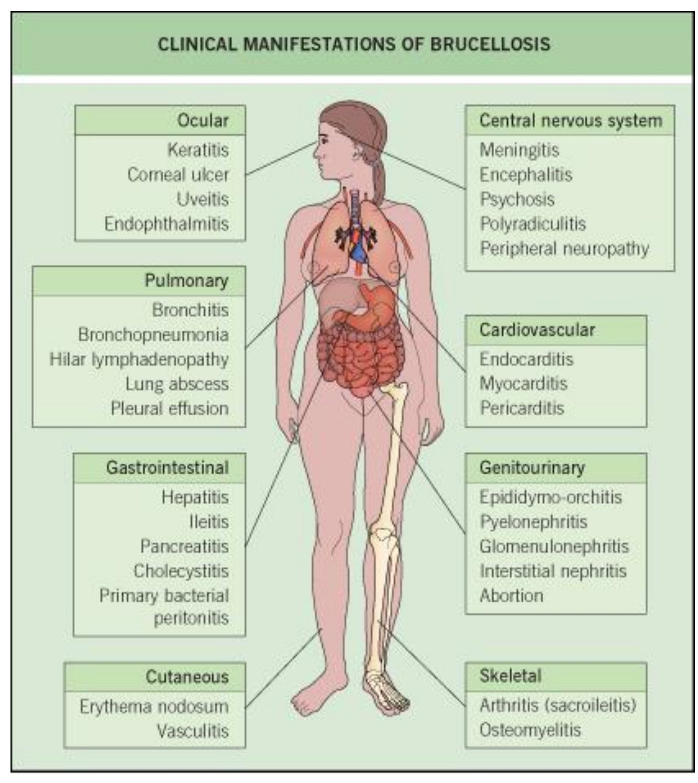
طيف المرض وأعراضه

1–طيف المرض: يُعَدّ داء البروسليات مرضاً جهازياً يصيب أي عضو أو جهاز في الجسم، وهناك أربعة أنواع مسؤولة عن معظم الحالات في الإنسان وهي البروسيلا المالطية (في الخراف والماعز)، البروسيلا المجهضة (في الماشية)، البروسيلا الخنزيرية (في الخنازير)، والبروسيلا الكلبية (في الكلاب)، ولقد تم تحديد إصابات في الإنسان بالنوع الحديث الذي يصيب الثدييات البحرية**(44،33)**.

تُشَكِّل البروسيلا المالطية السبب الرئيسي للمرض في الإنسان عالمياً، ولم تسجل الدراسات الحديثة أي تمايز سريري بين الحالات التي تسببها المالطية والمجهضة**(51)**.

وبالنسبة للبروسيلا المالطية نجد أنّ تحت الأنماط المسببة للمرض تختلف من مكان لآخر، حيث يسيطر biovar 1 في الهند وإسبانيا، و الـ biovar 2 في شمال غرب اليونان، و الـ biovar 3 في تركيا، ولذلك نجد التنوع الكبير في الأعراض السريرية**(53)**.

إنّ الجرعة الخامجة للبروسيلا وخاصة المالطية منها منخفضة جداً، وتكون فترة الحضانة للمرض عادة بين 7 أيام إلى 3 أشهر وقد تصل إلى 10 أشهر**(54،39)**.



© Elsevier 2004. Infectious Diseases 2e - www.idreference.com

2-المظاهر السريرية و الاختلاطات : يُعرفُ داءُ البروسليات بأعراضه المتبدلة والمتنوعة وغير النوعية بشكل كافٍ للتشخيص، ولقد تم جمع قائمة الأعراض من دراسات عديدة تم تنظيمها في مناطق عالية الوبائية بالبروسيلا(52).

والحمّى هي العرض الأشيع في هذا المرض، و تحدث في 80- 100% من الحالات ، وتحدث غالباً في الليل، وقد تترافق مع تباطؤ في القلب، كما نلاحظ شيوع الحمّى مجهولة السبب (FUO) في المناطق منخفضة الوبائية، هذا، وإن بعض المراجع تُعدّ التعرق الغزير سيّء الرائحة أشيع واسم مرضي(55).

لقد تم ذكر النخالية البيضاء كعلامة سريرية ثابتة التواجد مع الحرارة في معظم المرضى الأطفال(52).

يتظاهر داء البروسليات عادةً كمرض حاد (أقل من شهرين)، أو تحت حاد (2-12 شهر) والذي قد يتطور إلى مرض مزمن (أكثر من سنة) ذو اختلاطات شديدة، ولقد عَدّت بعض المراجع هذا التصنيف الكلاسيكي غير موضوعي، ومن ثَمَّ رأت أنّ الدور السريري في التشخيص أصبح محدّداً وقليل المصداقية(55).

يشكو المصاب عادةً من علامات وأعراض مشابهة للأنفلونزا مع بدء مخاتل. وبشكل عامّ نجد أنّ أشيع الأعراض تسجيلاً بعد الحمّى هي: العرواءات، والتعب، والتوعك، والتعرق، والألم العضلي، وألم المفاصل، وفقدان الوزن(56،57).

وبشكل أدقّ نلاحظ حدوث العرواءات في 80% من المرضى، وحدوث أعراض كالقهم، والوهن، والتعب، والضعف و التوعك في أكثر من 90% من الحالات.

أما الأعراض المفصلية والعظمية والتي تتضمن ألم المفاصل، وألم أسفل الظهر، وألم المفاصل والعمود الفقري، ونادراً تورم المفصل، فهي تحدث في 55- 80% من الحالات.

وقد يكون العرض الوحيد للمصاب هو الألم المفصلي، ألم أسفل الظهر، الحركة اللاإرادية للأطراف، الأقدام الحارقة، هجمات من نقص تروية القلب(31،52،58).

إنّ الأعراض النفسية العصبية شائعة على الرغم من ندرة غزو البروسيلا للجهاز العصبي. وأشيع الأعراض المسجلة : الصداع والاكتئاب.

أمّا الأعراض المعدية المعوية فموجودة في 50% من الحالات وتتضمن : ألم البطن، والإمساك، والإسهال، والإقياء. وأمّا الأعراض العصبية فتتضمن : الضعف، والدوار، والمشية غير الثابتة، وحصر البول.

ويتطور السعال وضيق التنفس عند 19% من الأشخاص المصابين، ونادراً ما تترافق الأعراض مع توضّع فعّال للبروسيلا في الرئة.

هناك قليل من العلامات السريرية التي تدل على المرض كتضخم الكبد والطحال مع أو بدون ضخامة العقد اللمفية، وقد تغيب هذه العلامات.

ينتج عن نقص العلاج الفعال في المرحلة الحادّة للمرض التوضّع المتعدّد للبروسيلا في النسج، ومن ثَمَّ الدخول في المرحلة تحت الحادّة أو المزمنة والتي تتميّز بتظاهرات سريرية شديدة. وإذا لم تتطوَّر الاختلاطات فإن المريض يُشفى في غضون أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع(**60،59**).

إنّ هذا المرض معروف باختلاطاته المتباينة والتي تعتمد على توضّع الإنتان،. حيث تمّ تسجيل الاختلاطات المفصلية العظمية، والبولية التناسلية، والمعدية المعوية، والعصبية، والقلبية الوعائية، والجلدية، والتنفسية.

ويحدث الاختلاط العظمي المفصلي في أكثر من 40% من الحالات وهوّ أشيع الاختلاطات، ومن أشكاله : التهاب المفاصل المحيطي (وهو الأشيع و يكون غير مشوهاً)، والتهاب الفقار، والتهاب المفصل العجزي الحرقفي(**61**).

ويُعَدّ التهاب البربخ والخصية في الرجال أشيع الاختلاطات البولية التناسلية، و قد يختلط مع سرطان الخصية أو سل الخصية(**64،63،62**).

يُعدّ الكبد العضو الأهمّ في الجهاز الشبكي البطاني الذي تغزوه البروسيلا في معظم الحالات كما أن الوظائف الطبيعية للكبد لا تنفي إصابته.

تغزو البروسيلا الجهاز العصبي المركزي في 5–7% من الحالات مسببةً التهاب السحايا، والتهاب الدماغ، والتهاب السحايا والدماغ، والداء الوعائي السحائي، وخراجات الدماغ، ومتلازمات زوال النخاعين، ونادراً ما يتم عزل البروسيلا من السائل الدماغي الشوكي على الرغم من إمكانية كشف الأضداد الموجهة لمختلف أنواع البروسيلا في المصل والسائل الدماغي الشوكي في أغلب الحالات(**65،52،31**).

يحدث التهاب الشغاف الإنتاني في أقل من 2% من الحالات ولكنه السبب الرئيسي للموت بهذا المرض(52).

تمّ تسجيل الاختلاطات الجلدية رغم ندرتها، كما نجد الاختلاطات التنفسية في عمال المسالخ، حيث يتعرّض هؤلاء لاستنشاق العامل الممرض، وقد ورد في بعض المراجع أنّ التوضع الرئوي للبروسيلا ليس نادراً(31،21).

هذا، وقد بدأت بعض التقارير تتحدّث عن ازدياد المظاهر غير المألوفة و الآفات غير المعهودة ، ويعود ذلك لتوافر الوسائل التشخيصية والمعرفة، ولقد ورد تطور لشلل العصب الوجهي الأيسر عند طفل، وفرفرية نقص صفيحات عند طفلٍ آخر(65،53).

الخلاصة : تخمج البروسيلا أي عضو في الجسم، وهذه الحقيقة تدعم تعزز ضرورة إدراج البروسيلا في التشاخيص التفريقية للأمراض في المناطق الموبوءة حتى في غياب المظاهر السريرية المتوافقة معها.

والجدول التالي يبين أعراض داء البروسليات وعلاماته عند 500 مصاب بالبروسيلا المالطية(43):

الحمّى	%93
العرواءات	%82
التعرق	%87
الألم الثابت	%91
نقص الطاقة والنشاط	%95
ألم المفاصل والظهر	%86
التهاب المفاصل	%40
مضض في العمود الفقري	%48
صداع	%81
نقص الشهية	%78
نقص الوزن	%65
الإمساك	%47
ألم البطن	%45
الإسهال	%7
الألم الخصوي/ التهاب الخصية والبربخ	21% (بين 290 رجل)

الطفح	%14
اضطرابات النوم	%37
الشحوب	%22
اعتلال العقد اللمفاوية	%32
ضخامة الطحال	%25
ضخامة الكبد	%19
اليرقان	%1
شذوذ الجهاز العصبي	%4
النفخات القلبية	%3
ذات الرئة	%1
السعال	%24

3-داء البروسليات المزمن(43): يبدو أنّ داء البروسليات المزمن هو أكثر مظاهر المــرض جــدالاً، وهذا يعود في جزء منه إلى الافتقار للتعريف العالمي المقبول له،. فمعظم المراجع تتفــق علـــى أن المرحلة المزمنة للمرض هي استمرار أعراض المرض لـ 12 شهراً أو أكثر من وقــت التشــخيص، ووفقاً لذلك قسمت المرحلة المزمنة لثلاث فئات، هي:

1) مرحلة النكس (relaps).

2) الإنتان الموضّع المزمن (cronic localized infection).

3) النقاهة المتأخرة (delayed convalescence).

والنكس هو معاودة الأعراض والعلامات المميزة للمرض (مع أو بدون إيجابية الزرع) في أي وقت بعد إتمام العلاج.

يشكو مرضى النكس عادة من أعراض الإنتان وعلاماته النموذجيــة كــالحمّى، إضــافة إلـــى استمرار ارتفاع عيارات أضداد الـ IgG في المصل.

كما أن معظم حالات النكس تحدث بعد 6 أشهر بسبب العلاج غير الفعال أو قصير الأمد، وليس بسبب السلالات المقاومة للصادّات، كما قد يحدث النكس عند استخدام دواء واحد للعلاج، وهو

الريفامبيسين أو الستريبتومايسين عادةً، ومن الممكن علاج النكس بإعادة نفس مجموعة الأدويـــة التي سبق للمريض عدم إكمالها والتقيد بالفترة الطويلة اللازمة لتناولها.

أما الإنتان الموضّع فهو معاودة الأعراض والعلامات (مع أو بدون زرع دم إيجابي)، وسببه الإخفاق في القضاء على البؤر العميقة للإنتان كما في التهاب العظم والنقي والخراجات العميقة.

وهؤلاء المرضى يشكون أيضاً من الأعراض النموذجية للمرض كالحمّى، وقد تتكرَّر الأعراضُ زمناً طويلاً.

وكما في حالات النكس، يستمر ارتفاع أضداد الـ IgG في المصل في حالات الإنتان الموضَّع ولكن يتطلَّب علاج الإنتان المُوَضَّع التداخل الجراحي لاستئصال بؤرة الإنتان، إضافة إلى العلاج بالصادات الفعالة.

وأمّا النقاهة المتأخِّرة فهي استمرار الأعراض مع غياب العلامات النوعية كالحمّى عند المرضى الذين أتمّوا علاجهم بالكامل والذين انخفضت لديهم عيارات الأضداد أو حتى اختفت. وأسباب هذا النوع غير معروفة، ولكن الدراسات الفيزيولوجية اقترحت الحدوث المرتفع للاضطرابات الشخصية عند بعض المرضى، ولا يبدي هؤلاء المرضى تحسناً بإعادة العلاج بالصادات الحيوية.

4-داء البروسلیات في الأطفال(43): تُعَدّ البروسيلا مرضاً نادراً في سنّ الطفولة، ويمكن القول إنّ البروسيلا تصيب الإنسان في أي عمر، وخاصة في المناطق التي تكون فيها البروسيلا المالطية سائدةً، أي إنَّ منهج المرض لا يكترث بعمر المريض.

5-داء البروسلیات في الحوامل(43): لا توجد دلائل ثابتة على أن معدّلات الإجهاض عند الحوامل المصابات بالحمّى المتموجة أعلى من تلك التي تسببها أمراض إنتانية أخرى إذا تم العلاج سريعاً،وعلى الرغم من ذلك يبقى إحداث البروسيلا للإجهاض العفوي في الحامل موضع خلاف وجدل.

وأمّا الإنتان داخل الرحم الذي تسببه البروسيلا المنتقلة للجنين فقد يُحدِث الولادة قبل الأوان عند بعض الولدان المخموجين، وقد يولد آخرون في الوقت المحدد، وتتضمن أشيع أعراض الإنتان داخل الرحم نقص وزن الولادة، والحمّى، وفشل النمو، واليرقان، وضخامة الكبد والطحال.

وقد يشكو بعضُ حديثي الولادة من صعوبة في التنفس، وهبوط في الضغط، والإقياء، إضافة إلى علامات الخمج الأخرى، وقد يكون الإنتان لاعرضياً أو متوسط الشدّة عند ولدانٍ آخرين.

والنقاط المفتاحية لمرض البروسايات في الإنسان هي:(43)

1. يظهر داء البروسليات في الإنسان كمرض حموي حادّ.
2. تسبب البروسيلا المالطية معظم الحالات.
3. جميع الأعمار معرّضة للإصابة.
4. تؤثر الاختلاطات في أي عضو وجهاز في الجسم.
5. قد يستمرّ المرض مسبباً النكس، والإنتان المزمن الموضع، أوالنقاهة المتأخرة.

الفصل السادس

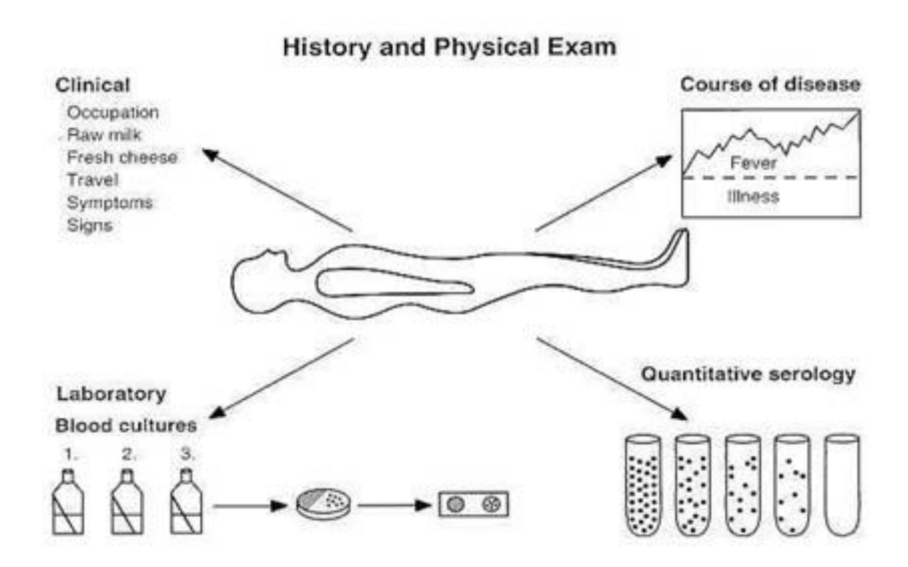
تشخيص داء البروسليات

يجب أن يستند الطبيب في تشخيص داء البروسليات على الآتي(16) :

1- المظاهر السريرية (clinical manifestations).

2- تاريخ التماس (history of contact) مثلاً قصة سفر لمنطقة موبوءة، التعرض لحيوان مخموج، التعرض المهني، أو تناول طعام مخموج، حيث تُعَدّ هذه المعلومات معيار التشخيص السريري.

3- التغيرات المخبرية (laboratory changes).



ويجب أن يشك الطبيب بالحمّى المتموجة عند كلّ مريض يشكو من الحمّى، ويعيش في منطقة موبوءة أو لديه قصة سفر لمنطقة موبوءة.

كما يجبُ، أن يتم جمع عينات الدم من المرضى في كلّ الحالات لإجراء الفحوص المخبرية عليها، لأنه من المستحيل الحصول على التشخيص الجازم لداء البروسليات بدون التأكيد المخبري .

إنّ التشخيص الصحيح والعاجل لداء البروسليات ضروري ومهم، وذلك لطول فترة العلاج الفعال بالصّادات النوعية. ويجبُ أن يكون الشك السريري بالحمّى المتموجة أعلى في المجموعات التالية : عمال المسالخ، والأطباء البيطريون، والعاملون في مراقبة اللحوم، والعاملون في

المخابر، وملاك المواشي، والعاملون في مزارع الألبان، والأشخاص الذين يستهلكون منتجات الألبان غير المعقمة، والصيادون، و المسافرون(66).

ويجب البحث عن التغيرات المخبرية في كلّ مما يلي : تعداد خلايا الدم (CBC) ، والدلائل الجرثومية (bacteriologic evidence)، والاختبارات المصلية (serologic tests).

1-تعداد خلايا الدم (CBC): والتغيرات الدموية الحاصلة في داء البروسليات هي:

1. نقص في عدد الخلايا المحببة في المرض الحاد.
2. زيادة في عدد الخلايا اللمفاوية في المرض المزمن.
3. زيادة الخلايا اللمفاوية غير النموذجية.
4. فقر دم بسبب فرط نشاط الطحال.
5. نقص صفيحات.
6. ارتفاع متوسط في سرعة التثفل.

2-التشخيص الجرثومي: يقدّم زرع الدم الدليل الحقيقي والصحيح على وجود المرض، ولكنه قد لا يعطينا نتائج إيجابية لدى كلّ المرضى حتى تحت الظروف المثالية(67).

يمكن عزل البروسيلا من العظم و الـ CSF و الجروح و القيح ....الخ، ويُعَدّ الدم العينة الأكثر استخداماً في الزرع الجرثومي. ويسمى جهاز زرع الدم المنصوح به الـ biphasic methods of Castaneda ، لأنه يستخدم الأوساط الصلبة والسائلة معاً في نفس الحاوي، وهذا يقلل الحاجة إلى الزرع الثانوي وينقص خطر الانتقال المكتسب في المخبر(43).

إنّ الطرق التقليدية المستخدمة في زرع الدم مثل Castaneda نادرة الإيجابية قبل اليوم الرابع من الحضن، والأغلبية تكون إيجابية في اليوم 17-21 من الحضن، و2% من الحالات فقط تكون إيجابية في اليوم 27، ولهذا السبب يجب ألاّ تقل مدة الحضن عن 6 أسابيع قبل إعطاء النتيجة السلبية(43).

ويُعدّ الوسط الحاوي على الببتون عالي النوعية أفضل وسط لنمو البروسيلا في زرع الدم. ويجب أن يتم الحضن في وسط هوائي وبوجود 5% CO_2 .

يعتمد تشخيص البروسيلا في الزروع على نوع المستعمرات الخشنة R أوالملساء S ، حيث يكون نوع المستعمرة في كل من البروسيلا المجهضة والمالطية والخنزيرية أملسَ، وهذا يتوافق مع وجود المستضدات السطحية A و M، بينما يكون نوع المستعمرة في البروسيلا الكلبية والبروسيلا Ovis خشناً، وهذا يتناسب مع وجود المستضد السطحي R.

تقيس مستعمرات البروسيلا 1–2 ملم قطراً، وتكون مستديرةً، كاملةً، لمّاعةً، شفيفةً، ذاتَ لون عسلي شاحب تحت ضوء النهار في وسط شفاف.



لا ينجح إنماء البروسيلا المجهضة في الدم عادةً، فنسبة الحالات الإيجابية 30%، بينما ينجح إنماء البروسيلا المالطية أو الخنزيرية في الدم عادة، ونسبة الإيجابية 85%(43).

تنمو البروسيلا ببطء نسبياً، ولذلك لا تتوفر نتائج الزرع قبل مرور أيام عديدة أو أسابيع، وخاصة في مرضى المرحلة المزمنة حيث تكون حساسية الزرع منخفضة.

تمّ مؤخراً التبليغ عن معدلات مرتفعة للزروع الإيجابية للدم تصل إلى 91% في المرحلة الحادة، و إلى 74% في المرحلة المزمنة(68).

حسّنت أجهزة زرع الدم الآلية الحديثة مثل Bactec 9204 و PCR/Alert إلى حدٍ ما سرعة الكشف عن البروسيلا، حيث يتم الكشف عنها في اليوم الثالث من الحضن، ولكن هذه الأجهزة لا تزال بطيئةً لإعطاء التشخيص السريع، ويجب أن يكون هناك أعداد كبيرة ومهمة من زروعات الدم المجراة بواسطتها للمقارنة مع الطرق الإضافية(43).

عُدَّ زرعُ نقي العظم المعيار الذهبي لتشخيص المرض في بعض الأبحاث، ولكن لم يتم تسجيل النتائج على مستوى العالم(69،70،89).

يُقَلِّل استخدام قوارير كاستانيدا من الزرع الثانوي، مقارنةً بالأوساط الصلبة، ويُنصح بإجراء الزرع الثانوي على وسط صلب عندما يكون النمو سلبياً بعد أسبوع من الحضن، يليه تحضير اللطاخات وصبغها بصبغة زيل نلسون المعدلة لتمييز البروسيلا عن المكورات والعصيات سلبية الغرام الأخرى، وعن العصيات الجلدية الناتجة عن التلوث(**43**).

يَندُر عزل البروسيلا المجهضة في الإنسان في دول حوض المتوسط لأسباب مجهولة،. ففي دراسة إسبانية على 2107 مرضى كانت البروسيلا المعزولة في 98% منهم من نوع المالطية، كما أن إيجابية زرع الدم في المرضى الذين يشكون من الحمّى كانت أعلى من 86.5%، أمّا مرضى الحمّى الغائبة أو خفيفة الشدّة، فقد انخفضت إيجابية زرع الدم لديهم إلى 28.5% و 70% على الترتيب(**43**).

تم ّتحديد السلالات البروسيلية عن طريق استخدام اختبارات التصنيف القياسية Standared classification tests والتي تتضمن صبغة الغرام، وصبغة زيل نلسون المعدلة، وخصائص النمو، وفعالية الأكسيداز، وفعالية اليورياز، وإنتاج غاز الـ H2S ، وتحمّل صبغة الفوكسين الأساسي (1:50000، 1:100000) والثيونين (1:25000، 1:50000، 1:100000)، وأخيراً اختبارات التراصّ المصلية(**43**).

وعَدّ بعضُ الباحثين أن استخدام صبغة الغرام للتمييز الشكلي للبروسيلا مع صبغة زيل نلسون المعدلة واختبار اليورياز كلها معاً كافية لتحديد جنس البروسيلا بسرعة، فيما لو كانت الوسائل الإضافية المستخدمة لكشف البروسيلا غير متوفرة(**43**).

وقد اقترحت إحدى الدراسات بأن الكشف عن البروسيلا (المستضد) بطريقة الإليزا يُعَدّ بديلاً مقبولاً عن زرع الدم على اعتبار أن الحساسية والنوعية لهذه الطريقة هي 100% و99,2% على التوالي(**71**).

إنّ طرق كشف المستضد مفيدة وممكنة، ولكنها لم تكن مقنعة أو سارية المفعول.

اعتمد الكشف المخبري عن البروسيلا وأنواعها بشكل كبير على العزل بالزرع، وعلى الأنماط الظاهرية phenotypes، ولكن تقنية الزرع طويلة، وتحتاج جهداً مضنياً، وتترافق مع خطورة عالية للإنتان المكتسب في المخبر وللتغلب على هذه المشاكل تمّ تضخيم الحمض النووي لإثبات الإصابة بالبروسيلا.

إنّ تقنية الـ PCR سريعة، ومن الممكن إجراؤها على أي عينة سريرية(72).

تمّ استهداف عدد من تسلسلات الحمض النووي لتطوير طريقة الـ PCR من أجل التشخيص النوعي لجنس البروسيلا، وإن البواديء ذات التسلسل الجيني النوعي المستعملة :

rRNA16S-23S intergenic spacer region, omP2a genes, bcps31, IS711& IS650 .

حديثاً، وضع RED KARET ET AL طريقة PCR الزمن الحقيقي للكشف عن البروسيلا المجهضة، والمالطية، والخنزيرية biovar1 واستهدف special intergration of IS711 elements داخل جينوم أنواع أوتحت أنواع معينة.

وقد تم تطوير PCR الزمن الحقيقي للإثبات السريع للبروسيلا، وتؤكد البواديء النوعية المستخدمة لجنس المجهضة والمالطية على وجود العضية في العينة المعزولة(73،74).

إنّ عزل البروسيلا الافتراضي يجب أن يخضع للمخابر المرجعية لتحديد نوعها ، والـ biovar المحدد، وهذا مفيد للوبائيات.

وإنّ بعض المراجع اعتمدت على الـ PCR للكشف المباشر عن البروسيلا في الدم، ويجب إجراء العديد من الدراسات قبل القول بأن الـ PCR بديل لزرع الدم.

يجب أن تتم معرفة الحساسية والنوعية لكلّ طريقة ومقايسة قبل تطبيقها في المخبر ، وتوفير إجراءات منع تلوث العينات مع DNA بكتيريا من بيئة المخبر(43).

في إحدى حالات داء البروسليات العصبي كانت عينة الـ CSF إيجابية بطريقة الـ PCR ، مع أنه نادراً ما يتم عزل البروسيلا من السائل الدماغي الشوكي CSF ، و كان التراصّ للحالة نفسها إيجابياً في الدم والـ CSF . أمّا الزرع فكان سلبياً في الدم والـ CSF، وهذا يُظهر فائدةَ الطرق الجزيئية في بعض الحالات.

يقوم التشخيص الأكيد لالتهاب السحايا والتهاب السحايا والدماغ على الزرع من الـ CSF، على الرغم من أنّ معظم النتائج تكون سلبية.

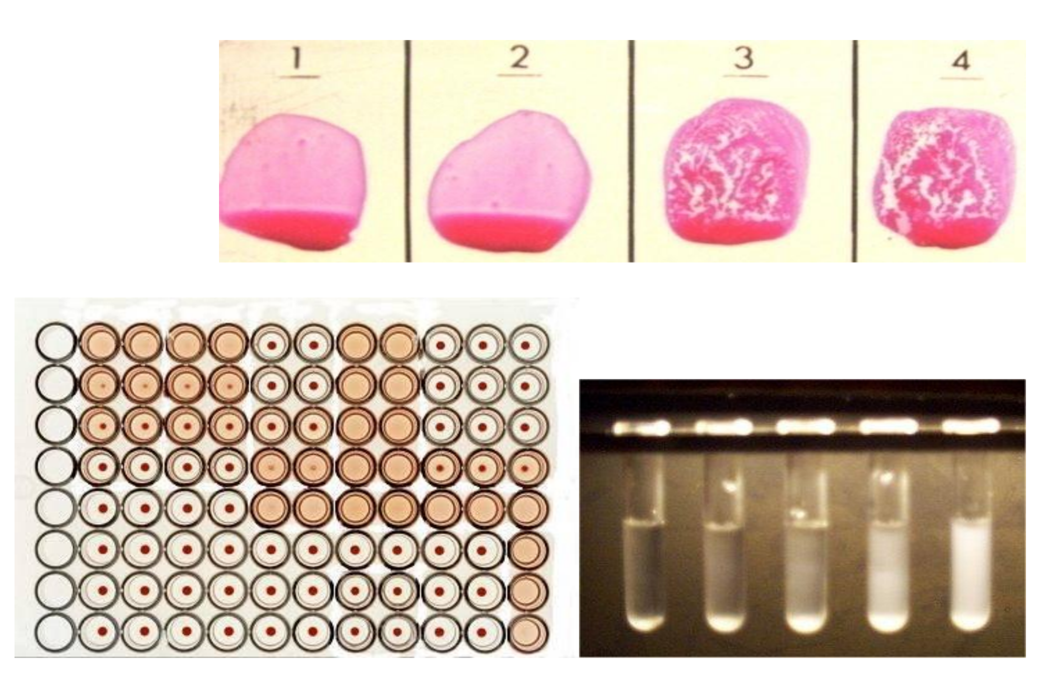
وغالباً مايكون الـ CSF شفّافاً، ونجد بالفحص ارتفاع عيار أضداد الـ IgG، واللمفاويات(43).

وعلى الرغم من كون الـ PCR واعداً جدّاً، إلا أنّ استخدام الطرق الجزيئيــة فـــي المنـــاطق الموبوءة بالبروسيلا يتطلب استطلاعاً و دراسات أكثر قبل أن يتم تطبيقه في التشـــخيص فـــي تلـــك المناطق بسبب الافتقار لتوحيد مقياس طرق الاستخراج المتبعة، و نقص اللوازم والمهارة ، إضـــافة إلى أن الفهم الجيد لمعنى النتائج ما يزال ناقصاً.

يبقى التشخيص الأمثل للبروسيلا قائماً على عزل العامل المسبب، وإنّ زرع الدم هو الطريقة المثلى للعزل، وبسبب ضرورة جمع العينات في فترة باكرة من المرض وقبـــل إعطـــاء الصـــادات، إضافة إلى حاجة الزرع لفترة طويلة من الحضانة والمعاناة من تكرّر الفشل فـــي كشـــف الجرثـــوم، واقتراح الـ PCR للتشخيص على الرغم من عدم اعتماده (روتينياً) في السنوات القليلة الأخيـــرة، كـــل ذلك جعل الاختبارات المصلية أكثر فائدة في تشخيص داء البروسليات في الإنسان(**43**).

3-التشخيص المصلي:

تظهر الأضداد في الدم عادةً، في نهاية الأسبوع الأول للمرض، حيث تظهر الـ IgM أولاً، وتكون الوحيدة في الأسابيع الأولى، وتصل إلى ذروتها في الشهر الثالث لتنخفض بعد ذلك، تليها الـ IgG التي ترتفع في الأسبوع الثاني، وتبقى مرتفعة لأكثر من عام، لكنها تنخفض خلال 6 أشهر في المرضى المعالجين، و تستمرّ في الارتفاع عند عدم حدوث الشفاء.



تمّ تطبيق جميع الاختبارات المصلية التالية في تشخيص داء البروسليات في الإنسان : روز البنغال (RBPT) ، واختبار التراصّ في الأنبوب (STA)، واختبار التراصّ السريع على شريحة ، واختبار 2-مركابتو إيتانول (2ME)، واختبار كومبس ، والتراصّ باللاتكس، وتثبيت المتممة (CFT)، والمقايسة المناعية بالربط بالأنزيم (ELISA)، واختبارات التراصّ بالقبط المناعي (Brucellacapt)، والمقايسة المناعية الشعاعية (RIA)، والمقايسة بالتدفق Flow assay (النسخة المعدلة المبسطة من الإليزا)، والمقايسة بالتألق بالاستقطاب (FPA) (flourecence polarization assay).

وفي هذا الجدول مقارنة بين الاختبارات المصليَّة من حيث نوع الأضداد المكشوفة بواسطتها(**48**):

الأضداد المكشوفة	الاختبارات
IgGو IgM معاً.	التراصّ بالأنبوب أو التراصّ على شريحة
IgG فقط.	2- مركابتو إيتانول
إذا كان STA سلبياً والمرض مزمن، يكشف فقط الـ IgG .	كومبس
إذا كان STA إيجابياً، يكشف الـ IgG و الـ IgM معاً.	كومبس
IgG فقط، ونعتبر العيار أكبر أو يساوي 1:16 إيجابياً.	تثبيت المتممة
IgG و IgM بشكل منفصل.	المقايسة المناعية الشعاعية
IgG و IgM بشكل منفصل.	المقايسة المناعية بالربط بالأنزيم

3-1-الاختبارات المصلية التي تكشف أضداد الـ S-LPS : يستخدم اختبار روز البنغال عادةً كاختبار ماسحٍ سريع، سهل القراءة، و تكون الحساسية فيه مرتفعة جدّاً أكثر من 99%، بينما تكون النوعيـــة منخفضة بشكل مُخَيِّب(**43**).

يكون اختبار روز البنغال ذا قيمةٍ كاختبار ماسح في المناطق الزراعية ذات الخطورة العالية حيث من غير الممكن دائماً إجراء اختبار التراصّ في الأنبوب (**43**).

.ولزيادة النوعية والقيمة الإيجابية لروز البنغال نقوم بتطبيقه على مصل ممدّد من 1:2 إلـــى 1:64، وتكون نوعية الاختبار مرتفعة عندما يحدث التراصّ في التمديدات المرتفعة، وتكون العيارات 1:8 أو 1:16 فما فوق إيجابية لكن حساسية الاختبار هنا تصبح منخفضـــةً، ومـــن الأفضـــل تأكيـــد الإيجابية بطريقة نوعية أكثر كالإليزا(**43**).

تُعَدّ طريقة روز البنغال قَيِّمةً أيضاً في التأكيد السريع للإصابة بداء البروسـليات العصـبي، والتهاب المفاصل بالبروسيلا، والتهاب البربخ والخصية بالبروسيلا، وذلك عنـدما يكـون الاختبـار إيجابياً في كلٍّ من السائل الدماغي الشوكي، والسائل الزليلي، والمني على التوالي(**52،31**).

يُعَدّ اختبار تثبيت المتمّمة فحصاً معقّداً، ويستخدم للمسح كاختبار روز البنغال، ولكن الأخير يحتاج لعينات أقلّ، كما لا يُنصَح بالاستخدام الروتيني لاختبار تثبيت المتمّمة في المخابر الصغيرة بسبب تعقيد التقنية.

تمّ تطوير اختبار التراصّ بالأنبوب SAT من قبل Wright و Colleagues في عام1897م وبقي الوسيلة التشخيصية الأكثر استخداماً في العالم، وذلك لسهولة تطبيقه، ولعدم حاجته للمعدات المكلفة أو للتدريب الخاص، وتُقاس به أضداد البروسيلا المجهضة، والمالطية، والخنزيرية، ولكنه لا يكشف عن أضداد البروسيلا الكلبية(**75،43**).

وقد أظهرت الدراسات أن نتائج تثبيت المتمّمة وSAT تكون إيجابيةً في 91,7 %، وتصبح عيارات تثبيت المتممة أعلى من SAT بعد 4 إلى 5 أشهر من المرض، بينما يكون تثبيت المتممة سلبياً وعيارات SAT مهمة في 4,6 % من المرضى في الأيام أو الأسابيع الفِعليَّة للمرض، ويكون SAT سلبياً وتثبيت المتممة إيجابياً في 3,7% من المرضى المزمنين أو المتعافين(**43**).

يقيس اختبار التراص الكمية الكلِّية للأضداد الرّاصّة (IgM وIgG)، ولتحديد كمّية الأضداد النوعية IgG نقوم بمعالجة المصل بـ 2مركابتو إيتانول (2ME)، الذي يفكك الروابط في جزيئة الـ IgM، ليكشف عن أضداد الـ IgG فقط.

وتصبح الـ IgG غير قابلة للكشف باختبار الـــ 2ME خلال 6−12 شهر من العلاج الفعّال والشافي، و تبقى راصات الـــ IgG مرتفعة عند المرضى الذين يطورون إنتاناً مستمراً.

تُعَدّ قيم التراص الأكبر من 1:160 مشخّصةً بوجود المظاهر السريرية الموافقـة، وتترافـق الحالات الحادة عادةً مع العيار الذي يكون أكبر من 1:160، أمّا في مناطق استيطان المـرض فـإن القيمة 1:320 تجعل الاختبار أكثر نوعيةً، أي: يجب إعطاء أولوية الاهتمام للمرضى الذين تظهـر لديهم العيارات 1:160 ← 1:320.

وتظهر لدى أكثر من 97% من المرضى خلال 3 أسابيع من المـرض تغيـراتٍ مصـليةً، وتبقى العيارات المهمة في اختبار التراص لأكثر من سنتين في 5−7% من الحالات، وقد نجد

عيارات مهمة في الحالات تحت السريرية، ومع ذلك لا يتم تشخيص البروســيلا بالاعتمــاد على عيارات الأضداد فقط.

قد لا يميز اختبار التراص بين الإنتان الفعّال و المرض المُعالَج، كما أن عيارات الأضــداد في الـ SAT قد تكون منخفضةً أو غائبةً في الحالات المزمنة، إضافةً إلى أنه يخفق في تمييز الحالات القديمة و الناكسة من الأمراض الحموية الأخرى**(77،43)**.

إنّ تمييز أنماط الأضداد مهمٌ أيضاً، حيث يُعَدّ الــ IgG مؤشراً جيداً للمرض الفعّال أكثر من الــ IgM، ويُعَدّ الانخفاض السريع في مستوى أضداد الــ IgG مُنذِراً على نجاح العلاج، ويجب قبول العيارات التي تكون أصغر من 1:160 إذا كان هناك أعراض وعلامات مرافقة لداء البروسليات**(80)**.

وقد عَدّت بعض المراجع أن العيار الأعلى من 1:160 هو المطلوب في المناطق الموبوءة ذات الانتشار الواسع للمرض في الحيوانات، لأن العديد من المرضى غير العرضيين يُظهرون هذا العيار**(43)**.

تحدث الإيجابية الكاذبة في اختبار SAT مع : التولاريميا، واليرسينيا الملهبة للأمعاء، والكوليرا، والسالمونيلا التيفية، ولقاح السالمونيلا التيفية، واختبارالبروسيلا الجلدي، وستينوتروفوموناس مالتوفيليا، والإشريكيا الكولونية O: 157، كما تحدث التفاعلات المتصالبة (cross-reactions) في اختبار التراص عندما تكون عيارات الأضداد الغيرية أقل من الأضداد الذاتية، والتي تتم إزالتها عن طريق الامتصاص**(76،43)**.

وتحدث السلبية الكاذبة في اختبار التراص في الحالات التالية : فرط الغاما غلوبيولين، الأسبوع الأول للمرض، البروسيلا الكلبية، البروسيلا المزمنة، وظاهرة البروزون (Prozon)**(54)**.

لا يتفاعل المستضد المستخدم في اختبار التراص مع البروسيلا الكلبية، وعند الشك بها يكون من الضروري استخدام اختبار مصلي خاصّ بها.

يتواجد المستضدان A و M في ثلاثة أنواع من البروسيلا، هي المالطية والمجهضة والخنزيرية، بحيث يسيطر المستضد A في البروسيلا المجهضة، و المستضد M في البروسيلا المالطية ، وإنَّ على كلّ الدول التي تُحضِّر مستضد الفحص المصلي أن تُحضِّر الأنواع السائدة لديها.

سجّلت الدراسة التي جرت في المملكة العربية السعودية عام 2002، مستوياتٍ متنوعة للأضداد بطريقة التراصّ في الأنبوب SAT في العديد من مرضى داء البروسليات المتعافين سريرياً(**81**).

تمت مؤخّراً دراسة على مرضى داء البروسليات الفعال، وامتدت هذه الدراسة فترةً طويلة، وتم فيها مراقبة أضداد البروسيلا بالـــ SAT والـــ 2M ، ولقد بقيت قيم SAT مُقاسة، ولكنها منخفضة في معظم الحالات على الرغم من العلاج الفعال و الشفاء السريري، وكذلك هبطت قيم 2ME في 97,5% من الحالات(**78،31**).

وهذا يعكس أهمية التشارك بين الاختبارين السابقين في متابعة المرض في المناطق المستوطنة.

إنّ الصعوبة في تحديد العيار الدالّ على المرض الفعال بطريقة التراص لا تزال مشكلةً قيد الحلّ، لأن لكلّ مريض استجابته المناعية الخاصة به، ومن غير الممكن التنبؤ بسلوك هذه الاستجابة ، وهذا ما يؤكده تطوير بعض المرضى للعيارات المرتفعة من الراصّات في المرض الحاد بينما يطور البعض الآخر عيارات منخفضة منها وكمقياس يمتلك العيار ≥ 1:160 قيمةً تشخيصيةً واضحةً طالما يشكو المريض من أعراض وعلامات المرض (**79،43**).

يكشف اختبار كومبس عن الأضداد القافلة غير الكاملة و غير الراصة أيضـــاً، والتـــي يـــتم الكشف عنها بإضافة أضداد للغلوبيولين المناعي البشري، وتُعَدّ قيمة كومبس التـــي تكـــون ≥ 1:40 إيجابيةً عندما يكون SAT سلبياً مع أعراض وعلامات المرض المزمن ، ولا ينصح بكومبس عنـــدما يكون SAT إيجابياً.

إنّ اختبار كومبس (كذلك القبط المناعي) لهما نفس الفعالية، مع حساسية ونوعية عالية في تشخيص المرض عند الإنسان في مراحله الأولى، وفي الحالات المستمرة لفترة طويلة قبل وضع التشخيص، إضافةً إلى حالات النكس وعودة الإنتان(**82**).

فعلى سبيل المثال تكون عيارات كومبس في المرض الحادّ أعلى بـ 4 – 16 مرة من عيارات SAT، بينما تكون عيارات كومبس في المرض المستمرّ طويلاً دون تشخيص أو علاج أعلى بـ 16– 256 مرة من عيارات SAT(**43**).

يكون اختبار التراصّ منخفض الإيجابية أو سلبياً في الحالات المزمنة، بينما يكون كومبس وتثبيت المتممة إيجابيّين، وفي بعض الحالات يعدّ كومبس الإيجابي مع تثبيت المتمّمة ذي العيار 1:16 دليلاً قوياً على استمرار الإنتان.

رُبط بين نتائج الإليزا IgG واختبار كومبس، حيث وُجِد أنهما يبقيان إيجابيّين وقتاً أطول من اختبارات التراصّ(**43**).

كذلك تتجنب الـ RIA صعوبات الأضداد غير الراصّة، وتميز بين المرض الحادّ والمزمن.

وإنّ المقايسة المناعيّة بالربط بالأنزيم غير المباشرة، تقيس الأضداد IgA, IgM, IgG التي تسمح بفهم أفضل للحالة السريرية، وتسمح أيضاً بدراسة تحت أنماط الغلوبيولينات المناعية، وتمييز المرض الحادّ والمزمن.

وينتج عن المقارنة بين التراصّ بالأنبوب و الإليزا حساسية ونوعية عالية(**83**).

وقد عُدّت الإليزا الاختبار الأكثر حساسيةً لتشخيص داء البروسليات العصبي(**65،84**).

يُظهِر تحليل المعلومات بأن الإليزا غير المباشرة مفيدةٌ في قياس أضداد الـ IgG، وهذا يفي بتبديل كومبس بها، ويُستَخدَم فيها المقترن anti IgG (Conjugate) و S-LPS، وتُعَدّ الإليزا ذات المقترن S-LPS اختباراً واعداً جداً(**85،43**).

تبدو الإليزا الاختبارَ الأكثرَ حساسيةً من بين الاختبارات المصلية الجديدة ، ومع ذلك مازالت الكثير من الدراسات مطلوبة قبل استبدال التراصّ بها.

طُوِّرَت مؤخراً المقايسات السريعة والبسيطة،. كالمقايسة بالتدفق، والتراصّ باللاتكس، وقد كانت الحساسية والنوعية للمقايسة بالتدفّق للمرض المثبت بالزرع أكثر من 95%، وكانت حساسية التراصّ باللاتكس للعينات المصلية الأولية في المرض المُثبَت بالزرع 89,1%، كما كانت النوعية 98,2%(**87،86**).

يتم السعي وراء كلا الاختبارين السابقين للاستخدام كاختبارات ميدانية في المناطق النائية، وكاختبارات معنية في المشافي ومراكز العناية الصحية التي تفتقر للمواد واللوازم لإجراء الاختبارات المصلية التقليدية الأكثر تطلباً للجهد والمثابرة والمهارة وغير ذلك(**87**).

يجب القيام بالمسح المصلي الروتيني في المناطق المستوطنة عند وجود الشكّ السريري القويّ، وذلك لتحسين مستوى كشف المرض(63).

3-2-الاختبارات المصلية التي تكشف الأضداد الموجهة لبروتينات العصارة الخلوية(43): دُرِسَت هذه الأضداد بواسطة الإليزا، واللطخة الغربية، والرحلان المناعي (CIEP).

وقد وُجد أنّ مصل المرضى الذين يظهرون عيارات مرتفعة باختبار كومبس يُنتج كميّات كبيرة من خطوط الترسيب وعيارات مرتفعة من الأضداد الموجهة للبروتينات في اختبار الـــ CIEP ، كما أَثبَت ازدياد عدد خطوط الترسيب الناتج عن تطور المرض غير الخاضع للتشخيص أو العلاج استمرار استجابة المرضى لفترة طويلة.

يظهر عند مرضى داء البروسليات العصبي، عيارات منخفضة من أضداد الـــ S-LPS في السائل الدماغي الشوكي CSF ، وكذلك تظهر لديهم أضداد بروتينات العصارة الخلوية، ويُكشَف عن هذه الأضداد باستخدام روز البنغال، والـ CIEP على الترتيب(43).

أوضحت دراساتُ الإليزا ظهور أضداد الـ S-LPS في الأشخاص الذين حدث لديهم تعرُّض للبروسيلا S حتى دون أن يتطور لديهم المرض السريري، أمّا الأشخاص الذين ظهرت لديهم الأضداد الموجهة لبروتينات مختارة فسيتطور لديهم المرض الفعّال بالضّرورة وتبقى عياراتِ هذه الأضداد مرتفعةً في مرضى الإنتان المستمر أو النكس، وتختفي في المتَعافين.

وقد حصلت النتائج نفسها بطريقة اللطخة الغربية.

إن هذه الطرق ليست كمية، كما يُعَدّ تأويلها ناقصاً وغير موضوعي، ولا تتوفر فيها الكواشف المرجعية(43).

4- **الاختبارات داخل الأدمة الجلدية :** إنّ تطوّر فرط التحسس المتأخّر لمستضـــدات البروســـيلا النوعية داخل الجلد دليلٌ على التعرّض المسبق للإنتان، ولا يدلّ على الإصابة الحالية، وقـــد استخدم هذا الاختبار سابقاً في بعض المناطق، ولكنه ليس من الاختبارات المنصـــوح بهـــا للتشخيص،. لأن تلك المستضدات الجاهزة غير المعيارية قد تُثير أضداداً أخرى تتداخل مع الاختبارات المصلية(43).

نقاط مفتاحية في تشخيص داء البروسليات في الإنسان(**43**):

1. يُعَدّ عزل البروسيلا من الدم أو النسج الأخرى مؤكداً في المرض الحاد.
2. يكون الزرع سلبياً بشكل خاص في المرض المزمن طويل الأمد.
3. إنّ التشخيص المصلي هو الوسيلة التشخيصية الأكثر استخداماً.
4. إنّ روز البنغال، التراصّ ، الإليزا هي الاختبارات المصلية المنصوح بها.
5. الطرق التي تميز بين الأضداد النوعية IgM و IgG قادرة على التمييز بين المرض الحاد والمزمن.
6. قد تحدث التفاعلات المصلية الإيجابية الكاذبة.
7. تؤكد إيجابية الفحص الجلدي على التعرض السابق وليس الفعال للبروسيلا.

الفصل السابع

العلاج والوقاية

1-العلاج : يُعَدّ إعطاء الدواء الفعال في وقته المُتَطَلَّب الأساسي لعلاج الحمّى المتموجة، والذي يقوم على أساس التآزر الدوائي بوجود دواء واحدٍ على الأقل يتميز بقدرته على النفوذ إلى داخل الخلايا ،كما يجب أن تكون مدة العلاج طويلةً، ومن الصائب متابعة الحالات وملاحقتها لتقييم الاستجابة للعلاج، بمساعدة الإليزا والـ 2ME(**87**).

يُعَدّ علاج البروسيلا في الإنسان مجالاً مثيراً للجدل بسبب طيف المرض، وإمكانية إزمانه وتطور الاختلاطات فيه(**88**).

وإنّ الفعالية السريرية للدواء لا تتطابق دائماً مع الفعالية في المخبر (in vitro) ، ومع ذلك فإنَّ العديد من الأدوية المضادة للبكتيريا تكون فعالةً مع جميع أنواع البروسيلا(**89**).

وبسبب ازدياد خطر الشفاء الناقص والنكس، يُعَدّ إتمام العلاج الدوائي مهمّاً جداً، وفي كل الحالات(**89**).

إنّ العلاج المنصوح به من قبل منظمة الصحة العالمية في داء البروسليات الحاد عند الكبار هو الريفامبيسين 600 – 900 مغ + الدوكسي سيكلين 100 مغ مرتان في اليوم لمدة 6 أسابيع على الأقل(**14**).

وما زال البعض يرى أنَّ الجمع بين الستريبتومايسين العضلي (1 غ / اليوم لمدة 2-3 أسابيع) و التتراسيكلين الفموي (2 غ / اليوم لمدة 6 أسابيع) يقلّل من النكس(**43**).

يُعَدّ التري ميثوبريم – سلفاميثوكسازول ذا شعبيةً كبيرة في العديد من المناطق، وتُعَدّ الكينولونات من الأدوية البديلة الأخرى(**90**).

تم استخدام السيبروفلوكساسين والأوفلوكساسين سريرياً، وقد أثبت هذا الجمع تأثيراً مشابهاً للعلاج الكلاسيكي، ومع أن النتائج كانت مشجعةً فإنَّ تأكيد صحة استخدام الفلوروكينولونات في علاج داء البروسليات يحتاج إلى دراساتٍ وخبراتٍ إضافيةٍ(**43،91**).

يقوم العلاج الناجح للأطفال على استعمال الدوكسي سيكلين 4 مغ / كغ اليوم + الريفامبيسين 10 مغ / كغ / اليوم، فموياً لمدة 6 أسابيع، وتنصح بعض المراجع بإضافة الجنتاميسين العضلي 5 مغ / كغ / اليوم في أول 5-7 أيام من هذا العلاج منعاً للنكس.(78)

من الممكن استخدام الكوتريموكسازول (TMP/SMX) عند الأطفال الذين تقل أعمارهم عن الـ 6 سنوات من العمر(92).

ويُعَدّ الريفامبيسين مع أو بدون الكوتريموكسازول آمناً خلال الحمل(83).

يحدث النكس بنسبة 10% من الحالات تقريباً، و يكون غالباً معتدل الشدّة، مقارنةً بالمرض الأولي، ويُعالَج بإعادة العلاج بالأسلوب المعتاد(83).

وتُعالَج معظم اختلاطات المرض بطرق مقياسية، حيث يتطلب علاجُ كلٍّ من التهاب الفقار اللاصق، التهاب العظم والنقي، وداء البروسليات العصبي ، والتهاب الشغاف الإنتاني بالبروسيلا الجمعَ بين الأدوية، ولكن لفترةٍ أطول من علاج المرض الأولي(94،93).

يستخدم في علاج داء البروسليات العصبي كلٌّ من الدوكسي سيكلين والريفامبيسين والتري ميثوبريم – سلفاميثوكسازول، لقدرتها على النفوذ إلى داخل الـ CNS(16).

وقد نجح الدوكسي سيكلين و الريفامبيسين والتري ميثوبريم – سلفاميثوكسازول في علاج التهاب الشغاف الإنتاني بالبروسيلا، لذلك تم الاعتقاد العام بأن التداخل الجراحي لتبديل الصمام بالمشاركة مع العلاج بالصادات يُعَدّ الوسيلة الأفضل لعلاج التهاب الشغاف الإنتاني بالبروسيلا(16).

نقاط مفتاحية في علاج داء البروسليات في الإنسان(43):

1- يُعدُّ تناول الصادات الفعّالة فترةً طويلة وكافية. العنصر الرئيسي في علاج جميع أشكال داء البروسليات في الإنسان.

2- يستخدم الدوكسي سيكلين 100 مغ / مرتين / في اليوم مدَّة 6 أسابيع + ريفامبيسين 600 – 900 مغ / في اليوم / مدَّة 6 أسابيع، في علاج الحالات غير المختلطة عند الكبار، والصغار (≤ 8 سنوات).

2- الوقاية: تعتمد الوقاية من المرض في الإنسان على السيطرة على المرض في الحيوانات الأهلية و الداجنة، عن طريق التلقيح الواسع والشامل لها(**43**).

وعلى الرغم من الفعالية السريرية للقاح فإنّ غلاءه، والتوافر المحدود له إضافة إلى نقص الوعي الصحي، أدّت جميعاً إلى استمرار المرض في معظم المناطق.

وقد أصبح واجباً على الأطباء والعاملين في العناية الصحية اتخاذ التدابير الوقائية بسبب الافتقار إلى اللقاحات البشرية، وعدم تطبيق الإجراءات الفعالة للسيطرة على المرض(**43**).

تُعَدّ الألبسة الواقية ضروريةً عند التعامل مع الحيوانات حديثة الولادة، ومع محصول الحمل، وزروع الدم، من أجل الإقلال من المرض المرتبط بالمهنة، كما أَنَّ تجنُّب منتجـــات الألبـــان غيـــر المعقّمة تمنع حدوث الإنتان في السكان عامة(**60،93،94**).

نقاط مفتاحية للوقاية من داء البروسليات في الإنسان(**43**):

1. تقوم الوقاية من المرض على النظافة والصحة المهنية والغذائية.
2. يجب أن تُحضَّر كل منتجات الألبان من الحليب المعالج حرارياً.
3. تجنب استهلاك الحليب النيء غير المعقم، أو منتجات الحليب غير المعقمة.
4. يجب طبخ اللحم بشكل كافٍ.
5. يجب أخذ الاحتياطات الخاصة من قبل العاملين في المخابر.
6. يجب أن يُحَذَّر العاملون في المجال الصحي والأطباء من احتمال الإصابة.
7. يجب نشر الوعي والثقافة العامة من أجل الحفاظ على النظافة و الصحة الغذائية والمهنية.

الفصل الثامن

بحوث في مجال الدراسة:

1. دراسة أجريت في الهند عام 2011م، من قبل الباحث Sathyanarayan MS وهي بعنوان(95):

دراسة مقارنة اختبارات التراصّ، زرع الدم، الإليزا في التشخيص المخبري للحمى المتموجة عند الإنسان

A comparative study of agglutination tests, blood culture & ELISA in the laboratory diagnosis of human brucellosis

شملت الدراسة على 42 مريضاً مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموجة ، تم تأكيد المرض عند 13 مريضاً منهم ، وكانت النتائج الإيجابية للمرضى كالتالي:

اختبار التراصّ ≥ 1:160: 30.8%، اختبار التراصّ ≥ 1:80 : 53.8%، الإليزا IgG: 38.5%، الإليزا IgM : 84.6%.

النتيجة: الإليزا أكثر مصداقية و سرعة من التراصّ في تشخيص مرض الحمّى المتموجة.

2. دراسة أجريت في الهند عام 2010م، من قبل الباحث Basappa Mantur وهي بعنوان(96):

الإليزا مقابل الطرق التقليدية المستخدمة في تشخيص داء البروسليات في المناطق الموبوءة

ELISA versus Conventional Methods of Diagnosing Endemic Brucellosis

شملت الدراسة على 92 مريضاً مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموجة ، تم تأكيد المرض عند 56 مريضاً منهم و كانت النتائج الإيجابية لهؤلاء المرضى كالتالي: SAT (≥ 1:160):41% ، الإليزا : 100%

النتيجة: الإليزا أكثر حساسية بكثير مقارنة مع التراصّ في تشخيص الحمّى المتموجة.

3. دراسة أجريت في إيران عام 2009م، من قبل الباحثRavikumar RAmirzargar وهي بعنوان(97):

مقارنة الطرق التشخيصية لدى المرضى المقبولين في المشفى لإصابتهم بداء البروسليات في إيران

Comparison of Diagnostic Methods in Hospitalized Patients With Brucellosis in Iran

شملت الدراسة على 45 مريضاً، وكانت النتائج الإيجابية لهؤلاء المرضى كالتالي: SAT (≤ 1:160): 71.11%، الإليزا IgM: 40%، الإليزا IgG: 97.77%.

النتيجة: الإليزا أكثر حساسية مقارنة مع التراصّ في تشخيص الحمّى المتموجة.

4. دراسة أجريت في إسبانيا عام 2008م، من قبل الباحثM. Concepcio´n Go´mez وهي بعنوان (98):

تقييم طرق التشخيص المصلية السبعة لداء البروسليات في منطقة موبوءة بالمرض

Evaluation of Seven Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in an Area Where the Disease Is Endemic

شملت الدراسة على 25 مريضاً، وكانت النتائج الإيجابية لهؤلاء المرضى كالتالي : الإليزا IgG : 84% ، الإليزا IgM: 60%، الـ SAT ≤ 1:160: 100%.

النتيجة: الإليزا مقايسة سريعة، حساسة ونوعية ولكنها ليست أفضل من التراصّ في تشخيص الحمّى المتموجة.

5. دراسة أجريت في إيران عام 2008م، من قبل الباحث Farzad Heydari وهي بعنوان(99):

مقارنة اختبار التراصّ بالأنبوب و الإليزا في تشخيص داء البروسليات في إقليم غرب أذربيجان، إيران

Comparison of Standard Seroagglutination Tests and ELISA for Diagnosis of Brucellosis in West Azerbaijan Province, Iran

لقد تمت الدراسة على 280 مريضاً مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموجة، تأكيد المرض عند 174 مريضاً منهم وكانت النتائج الإيجابية لهؤلاء المرضى كالتالي: الإليزا (100%)، وكان الـ SAT ≤ 1:160 (58.6%)، و الــ SAT < 1:160: 76.4 %. النتيجة: الإليزا أكثر حساسية مقارنة مع التراصّ في تشخيص الحمّى المتموجة.

دراسة أجريت في تشيلي عام 2008م، من قبل الباحث Oporto C JAranís J C , وهي بعنوان(**100**):

فائدة تحديد أضداد الـ IgG و IgM بطريقة الإليزا والقبط المناعي في مرضى داء البروسليات عند الإنسان

Usefulness of the Determination of IgG and IgM Antibodies by ELISA and Immunocapture in a Clinical Series of human Brucellosis

شملت الدراسة على 10 مرضى، و كانت النتائج الإيجابية للمرضى كالتالي : الـ IgG إيجابي في 8 مرضى، والـ IgM إيجابي في 5 مرضى، والـ SAT (≤ 1:160) إيجابي في 7 مرضى.

النتيجة: الإليزا أكثر حساسية مقارنة مع التراصّ في تشخيص الحمّى المتموجة.

6. دراسة أجريت في تركيا عام 2006م، من قبل الباحث Mustafa ERTEK1 وهي بعنوان(**101**):

مقارنة القيمة التشخيصية لاختبار التراصّ في الأنبوب و الإليزا IgG و IgM في مرضى الحمّى المتموجة

Comparison of the Diagnostic Value of the Standard Tube Agglutination Test and the ELISA IgG and IgM in Patients with Brucellosis

شملت الدراسة على 32 مريضاً، وكانت النتائج الإيجابية للمرضى كالتالي: اختبار التراصّ (≤ 1:160): 93.8%، الإليزا IgM: 100%، الإليزا IgG: 81.25%.

النتيجة: الإليزا أكثر حساسية مقارنة مع الــSAT و لكن يفضل الــ SAT على الإليزا في تشخيص المرض الحاد لأنه أقل تكلفة و أسهل استخداماً.

7. دراسة أجريت في تركيا عام 2005م، من قبل الباحث Oztürk FCiftçi C , وهي بعنوان(**102**):

مقارنة الاختبارات المصلية المستخدمة في التشخيص المخبري لداء البروسليات

Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis

شملت الدراسة على 35 مريضاً، وكانت النتائج الإيجابية للمرضى كالتالي:

SAT ≤1:160 94.3%، الإليزا IgG: 97.1%، الإليزا IgM: 71.4%.

النتيجة: لا يزال التراصّ الطريقة الفعالة في التشخيص المصلي للحمى المتموجة.

8. دراسة أجريت في تركيا عام 2002م، من قبل الباحث Sirmatel F, وهي بعنوان(103):

تقييم طرق التشخيص المصلية لداء البروسليات

Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis of brucellosis

شملت الدراسة على 184 مريضاً، وكانت النتائج الإيجابية للمرضى كالتالي: SAT (≤ 1:160): 83.7%، الإليزا IgG: 61.9%، الإليزا IgM: 49.5 %.

النتيجة: التراصّ هو الاختبار الأكثر مصداقية في التشخيص المصلي للحمى المتموجة.

المقارنة بين التراص على شريحة والتراص في الأنبوب:

1.دراسة أجريت في أمريكا عام 1971م، من قبل الباحث JERRY B بعنوان(104):

إجراءات التراصّ المتعلقة باختبارات التراصّ الحموية

Microagglutination Procedures for Febrile Agglutination Tests

وجاء في الملخص:

بمقارنة نتائج 23 مصل ظهر لدينا أن تقنيات التراصّ في الحجرات، التراصّ على شريحة، التراصّ في الأنبوب أعطت عيارات متشابهة.

يظهر كلاً من التراصّ في الحجرات، التراصّ على شريحة، التر اص في الأنبوب، توافقاً ممتازاً.

2.دراسة أجريت في الأردن عام 1992م، من قبل الباحثين يحيى فايد وسليمان الخليل بعنوان(105):

التشخيص المصلي للحمى المالطية باستخدام طريقتي التراصّ على شريحة والتراصّ في الأنبوب

LABORATORY DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS USING THE SLIDE AND STANDARD TUBE AGGLUTINATION METHODS

وجاء في الملخص:

أُجريَت الدراسة على 112 عينة دم لتشخيص الحمّى المتموجة بطريقتي التراصّ في الأنبوب والتراصّ على شريحة، وقد وجد أن هناك تناسباً في استعمال الطريقتين حيث كانت نتائج كلا الطريقتين مشابهة لنتائج الطريقة الأخرى.

الباب الثاني

القسم العمليّ

الفصل الأوّل: مجال الدراسة وخطّتها

الفصل الثاني: المعدّات المخبريّة المستخدمة

الفصل الثالث:الطرائق المخبريّة المتّبعة في المعايرة

الفصل الرابع: الطرائق الإحصائية المستخدمة في تقييم بعض النتائج

الفصل الأول

مجال الدراسة وخطّتها

1-**مجال الدراسة:** تمّتْ هذه الدراسةُ بين شهري نيسان وأيلول من عام 2010، وشملت (108) مرضى مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموّجة. وقد شُخِّصَ المرض عند (89) مريضاً منهم.

قُيِّمتْ المقايسةُ المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا IgM, IgG) في المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمى المتموجة، و قورِنَتْ نتائج الإليزا باختبار التراصّ على شريحة.

2-**خطّة الدراسة:** شُخّص المرض على أساس وجود المظاهر السريريّة للمرض، وقصة التعرّض للعامل الممرض، والنتائج الإيجابية للاختبار المصلي (التراصّ السريع على شريحة ≤ 1:80 و/ أو الإليزا غير المباشرة). وقد قورِنَت نتائج الإليزا بنتائج التراصّ العائدة لأوّل قياس (أي دون الحاجة لإعادة الفحص بعد أسبوعين)، أي: تمّتْ الدراسةُ على المرضى المقبولين مباشرة.

وقد اخترتُ عيار التراصّ الإيجابيّ المُشَخِّص في هذه الدراسة حسب الكيت وبالتوافق مع الدراسة الهندية**2011**، على الرغم من أنّ العيار المُشَخِّص حسب الدراسات المقارنة **الأخرى** وحسب بعض المراجع هو ≤ 1:160 ، حيث أنّ مشكلة تحديد عيار التراصّ الدالّ على الإنتان الفعّال ما تزال قيد الحلّ؛ لأنّ لكلّ مريض، بشكل عامّ، استجابةٌ نوعيّةٌ خاصّةٌ به، تجعل التنبؤ بسلوك هذه الاستجابة أمراً مستحيلاً، وهذا ما يُفَسِّرُ سببَ تطوّر عيارات عالية من الأضداد عند البعض، بينما يطوّرُ آخرون عياراتٍ منخفضةً خلال المرض لذلك – كمقياس – يمتلك العيار ≤ 1:160 القيمة التشخيصيّة الواضحة للمرض الفعّال طالما يعاني المريض من أعراض الحمّى المتموّجة وعلاماتها(**37**)

كان متوسط عمر المرضى (24.38 ± 17.59) ومعظم الحالات تتراوح أعمارهم بين 2 سنة و15 سنة، وكان التركيب الجنسي للمرضى (49) ذكراً و(40) أنثى.أمّا أعراض المرض وعلاماته التي تم تسجيلها (الحمّى ، ألم المفاصل والظهر ، الألم العضلي، التعب العام، التعرّق، الصداع، ضخامة الكبد، الحمّى مجهولة السبب)، وقد كانت الحمّى هي العرض السائد في معظم المرضى؛ حيث بلغت نسبتها 92%.

3-نموذج الدراسة : بعد التعقيم المناسب لمكان سحب العينة باستخدام الكحــول الإيتيلـــي 65 % ، وبعد جفاف مكان بزل العينة من الجلد سُحِبَ حوالي 3 مل من الدم الوريدي ووُضِعَ في أنابيب جافة، ثم تثفيلها بسرعة (2000) دورة / الدقيقة لمدة (10) دقائق للحصول على المصـــل، ثـــمّ فُصِـــلَ المصلُ لإجراء اختبار رايت عليه، ونُقِلَ الباقي إلى أنبوب إيبندروف وحُفِظَ في المجمّدة فـــي درجـــة حرارة (-26) درجة مئوية إلى حين إجراء اختبار الإليزا بالطريقة غير المباشـــرة للكشـــف عـــن الأضداد النوعية من نوع IgG وIgM للبروسيلا في المصل باستخدام الغشاء الخارجي للبروســـيلا المجهضة (S-LPS) كمستضد.

وقد أُجرِيَ اختبار التراص على شريحة في قسم المخبر في مشفى حلب الجامعي، كما أُجري تفاعل الإليزا في مخبر أبحاث كلية الطب البشري في جامعة حلب، وسُـــجّلت المعلومـــات والنتـــائج الخاصة بكل مريض في استمارة خاصة كما يلي :

استمارة البحث

المعلومات الشخصية:

الاسم: **العمر:** **مكان الإقامة:**

الجنس: **المهنة:** **رقم الهاتف:**

التظاهرات السريريّة وتاريخ بدئها:

قصة التعرّض للعامل المسبّب:

سوابق مرضيّة بالحمّى المتموّجة (خمج مسبق بالبروسيلا):

قصة معالجة دوائيّة للحمّى المتموّجة:

الفحوص المخبريّة المستخدمة :

1. **اختبار التراصّ على شريحة (اختبار رايت):**
2. **اختبار الإليزا IgG و IgM:**

الفصل الثاني

المعدّات المخبريّة المستخدمة

- حوامل للأنابيب المستخدمة.
- أنابيب زجاجية جافة ونظيفة
- أنابيب إبيندورف 1.5 مل.
- موزِّعات يدوية pipettes ذات سعة 0.005،0.05،0.1، 0.2، 0.25 مل.
- مجمدة لحفظ العيّنات في الدرجة −26 مئوية.
- مثفلة أنابيب.
- جهاز ELISA (Personal Lab Junior).
- شرائح زجاجية نظيفة.
- عيدان خشبية للمزج.
- مجهر ضوئي.
- لوازم اختبار الإليزا.
- لوازم اختبار التراصّ على شريحة.

الفصل الثالث

الطرائق المخبرية المتّبعة في المعايرة

1- كشف أضداد البروسيلا بطريقة التراصّ (اختبار رايت): أَجريَتُ هذا الاختبار في قسم المخبــر في مشفى حلب الجامعي للتحري عن الأضداد النوعية للبروسيلا باستخدام المستضدّات الجرثوميــة الراصّة A و M لشركة Laboratory Diagnostic، وهذه المستضدّات هي معلّقــات جرثوميّــة، تُستخدم في اختبارات التراصّ على شريحة أو في الأنبوب لكشــف الأضــداد الجرثوميّــة الراصّــة (bacterial agglutinins) المرافقة للإنتان بالبروسيلا أو للتعرّض المسبق لها.

والاختباران اللذان يُنصح بهما هما: التراصّ السريع على الشريحة، والتراصّ في الأنبوب.

يُعَدُّ اختبارُ التراصّ في الأنبوب هو الاختبار المعياريّ لقياس أضداد البروسيلا، ولكنّ اختبارَ التراصّ على شريحة هو الأسهل والأكثر سرعة وشيوعاً واستخداماً في مخابر المشافي.

تظهر الأضداد بعد دخول البروسيلا إلى الجسم بمدّة، تتراوح ما بين أســبوع وأســبوعين، وتصل إلى ذروتها بين الأسبوعين الثالث والسادس.

1-1-كيفيّة إجراء اختبار رايت :يجرى اختبار رايت بطريقتين، هما:

1)-طريقة الأنابيب: وتمتاز بدقّة أفضل، وحساسيّة أكبر، غير أنّها أبطأ وأكثــر تكلفــة بكثيــر. ولا تجرى هذه الطريقة إلا في المراكز العلمية والدول المتطورة، ولذلك فهي قليلة الاستعمال.

2)_ طريقة الشرائح: وتمتاز بأنّها أكثر سرعة، وأقل تكلفة، وهي الأكثر استخداماً، غير أنّها أقلُّ دقّةً وحساسيةً من اختبار التراص في الأنابيب.

وقد استُخدمت طريقةُ التراصّ على شريحة في هذه الدراسة لأنّها الطريقة المستخدمة فــي مشافي القطر العربي السوري ومخابره عامة، وفي مدينة حلب خاصة.

1-2 طريقة الشرائح: والأدوات المستخدمة في هذه الطرقة هي:

1) شرائح زجاجية نظيفة.

2) pipettes بقياس 5 ميكرونات،10 ميكرونات، 20 ميكروناً.

3) عيدان خشبية للمزج.

الكواشف الحاوية على المستضدات الجاهزة للبروسيلا المجهضةA والبروسيلا المالطيةM.

1-3- تخزين الكواشف :لا يجوز تجميد الكواشف، بل تحفظ في البراد في درجة حرارة 2- 8 درجة مئوية، وتحفظ في الظلام لأنّها حسّاسة للضوء.

1-4- طريقة العمل: نأخذ شريحة نظيفة ونكتب عليها في كلّ طرف A و M لمنع حدوث الخطأ.

نضع(5) ميكرونات من مصل المريض غير الممدّد في كلّ جانب ونضع قطرة عيارية من المستضدّ المناسب لما هو مكتوب على الشريحة، نمزج بعود خشبي أو بلاستيكي مع الفرش والتدوير دون اختلاط أو تلوّث قطرة المستضدّ مع الأخرى فإذا حصل التراصّ، فهذا يعني أنَّ تركيز الضدّ الموافق أكثر أو يساوي 1:320 وإنْ لم يحصل التراصّ نضيف (5) ميكرونات أخرى من مصل المريض فوق ما سبق، ونمزج مع التدوير، فإذا حصل التراصّ فهذا يعني أَنَّ تركيز الضد الموافق 1:160 وإنْ لم يحصل التراصّ نضيف (10) ميكرونات من مصل المريض، ونمزج مع التدوير، فإذا حصل التراصّ فهذا يعني أَنَّ تركيز الضدّ الموافق 1:80 وإنْ لم يحصل التراصّ نضيف 20 ميكروناً من مصل المريض، ونمزج مع التدوير، فإذا حصل التراصّ فهذا يعني أَنَّ تركيز الضدّ الموافق 1:40 وإنْ لم يحصل التراصّ نضيف أخيراً 40 ميكروناً من مصل المريض، ونمزج مع التدوير، فإذا حصل التراصّ فهذا يعني أَنَّ تركيز الضدّ الموافق 1:20 وإنْ لم يحصل التراصّ نعطي النتيجة: سلبي للضدّ الموافق.

وعند الحصول على التركيز أكثر أو يساوي 320/1 قد يكــون التركيــز الصــحيح هــو 640/1 - 1280/1- 1560/1 ....إلخ . ولكي نصل إلى التركيز الصــحيح نمــدّدُ المصــلَ بالسيروم الملحي بنسبة 1:2 ، ثمّ نجري التفاعلَ على (5) ميكرونات، فإذا لــم يحــدث التــراصّ فالنتيجة حتماً 1:320، أما إذا حدث التراصّ فنمدّدُ المصل بنسبة 1:4 بالسيروم الملحي، ثم نعيــد الاختبار على (5) ميكرونات وهكذا حتى يتوقف التراصّ، عندها نثبّتُ النتيجة .

وفي هذه الدراسة أُنجز اختبار التراصّ من العيار 1:20 إلى العيار 1:1280، و عُدّتْ العيارات الإيجابية هي العيارات ≤ 1:80، وعُدَّ العيار السلبي هو العيار الأقل من 1:80.

المصل: ميكرون أو (مل)	5 أو(0.005)	10 أو(0.01)	20 أو(0.02)	40 أو(0.04)	80 أو(0.08)
النتيجة	1:320	1:160	1:80	1:40	1:20

لقد أثبتت الدراسات التوافق بين طريقتي التراصّ على شريحة والتراصّ في الأنبوب. ‹83،82›

اعتمدت الدراسة الحالية كما ذكرنا على طريقة التراصّ على شريحة لأنها المستخدمة في بلادنا لسهولة تطبيقها وانخفاض كلفتها.

1-5- دلالات اختبارات التراصّ :

1. لا يوجد علاقة بين ارتفاع العيار وشدة المرض .
2. تكشف هذه الاختبارات عن مجموع الأضداد (Ig M + Ig G) فإذا أردنا الكشف عن مرحلة المرض ومن ثمَّ تحديد الضدّ المسيطر فإننا نلجأ إلى الإليزا أو إلى مادة الـــ 2 مركابتو إيتانول وهذه الأخيرة ليست نوعية تماماً للـــ IgM لذلك يجب تأويل نتائجها بشكل حذر. وإنّ اختلاف نتائج الـــ 2ME والإليزا IgG يعود لقدرة الإليزا على كشف الكميات الصغيرة من أضداد الـــ IgG غير الراصّة التي يُخفق الـــ 2ME في كشفها.
3. يختلف الـــ cut off بالنسبة للعيارات الإيجابية والسلبية في اختبار التراصّ تبعاً للعيّنة المفحوصة و للمستضدّ المستخدم وللموقع الجغرافي للمنطقة: أ هي موبوءة أم غير موبوءة ؟
4. يجب إعادة التحليل بعد أسبوعين أو ثلاثة قبل بدء العلاج، وإّن الزيادة الملحوظة في عيار الأضداد 4 أضعاف أو أكثر تؤكد نشاط المرض، وإنَّ عدم الزيادة في عيار الأضداد يثبت أنّ الإصابة قديمة وغير فعّالة، وأنّها لا تحتاج إلى علاج.

ملاحظات:

1.يجب ألا تؤخذ نتائج المصليات بمعزل عن الموجودات السريرية.

2. إنّ المعالجة بالصادّات لا تتداخل مع شدّة التراصّ أو عياره.

3. هناك تفاعلات متصالبة (الإيجابية الكاذبة) مع اليرسينيا والفرانسيسلا والكوليرا والتولاريميا، ويتم تجنّبها بتمديد المصل أكثر من 1:320.

4. بعد إتمام علاج الحمّى المتموّجة تبقى العيارات مرتفعة لدى بعض الناس 320/1 أو أكثر، وتختلف مدة بقائها من شخص لآخر حيث تتراوح من 3 أشهر حتى العام و لكنها تكون ثابتة غير مرتفعة و تكون على حساب IgG.

5. لا نعدُّ عيار اختبار التراص مهمّاً إلا إذا كان ≤ 1:80 سواء للنوع A أو M وذلك حسب معطيات الكيت.

6. من الشائع حدوث تفاعل متصالب بين اختبار فيدال واختبار رايت .

7. قد يغيب التراصّ أحياناً في التمديدات المنخفضة ويظهر في التمديدات المرتفعة بسبب وجود الأضداد القافلة غير الراصّة في المصل (عادة من نوع الــ IgA)، حيث تكون التمديدات 1:80، 1:160 ،1:320 إيجابية بينما تكون التمديدات 1:20، 1:40 سلبية، و تسمّى هذه الحالة ظاهرة البروزون (prozon). وهي من أسباب السلبية الكاذبة في اختبار التراصّ، وتصبح هذه الظاهرة قليلة الأهمية في الممارسة السريرية طالما يتمّ تمديد المصل روتينياً أكثر من 1:320.. الحالات السلبية الكاذبة الأخرى: الأسبوع الأول للإنتان البروسيلا الكلبية، داء البروسليات المزمن.

9. يتفوق اختبار الــ 2ME على اختبار التراص في تحديد كفاية العلاج بالصادات بالنسبة لمرضى الحمى المتموجة فالــ 2ME السلبي دليل قوي ينفي إزمان هذا المرض لأن الأضداد المقاومة (IgG) والأضداد الحساسة (IgM) للــ2ME تَنقُص في المرضى المعالَجين بشكل سريع ولذلك يُعدُّ الــ 2ME أداةً واعدةً في تحديد إنذار مرض الحمى المتموجة.

8. قد تحدث النتائج الكاذبة نتيجة عدم ترك الكواشف في درجة الحرارة قبل استخدامها أو بسبب تأخر قراءة النتائج أكثر من دقيقة بعد المزج.

2–كشف أضداد البروسيلا IgM،IgG بطريقة المقايسة المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا) ELISA: تُستخدَم الإليزا IgG ، IgM لتقييم المرضى المشكوك بأنّهم مخموجون بالبروسيلا، وقد أُجري هذا الاختبار باستخدام جهاز الإليزا Personal Lab Junior في مخبر أبحاث كلية الطب البشري جامعة حلب، وكانت المواد المخبرية الكاشفة من شركة كلينوتيك الكندية Clinotech Diagnostics حيث تمّ التحري عن الأضداد النوعية **IgG** ، **IgM** بطريقة الإليزا غير المباشرة **Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay**، باستخدام الغشاء الخارجي للبروسيلا المجهضة (S-LPS) كمستضد.

تبقى أضداد الـــ IgG سنوات عديدة بعد الإنتان، وتعبّر الزيادة المهمّة في الـــ IgG علـــى إصابة حديثة طالما يعاني المريض من أعراض الحمّى المتموّجة، كما يُعَدُّ الـــ IgG مؤشـــراً جيـــداً على المرض الفعّال أكثر من الـــ IgM . وقد كانت الحساسية والنوعية للإليزا حسب الكيت 92% و 99.3% بشكل منفصل.

يمكن تأويل نتائج الإليزا حسب الجدول التالي:

الأضداد المسيطرة IgG	الأضداد المسيطرة IgM+IgG	الأضداد المسيطرة IgM
الإزمان المتأخّر	المرض الحاد المرض تحت الحادّ النقاهة	الأسبوع الأول من الإنتان

2–1– الكواشف المخبريّة المستخدمة: يحتوي كلُّ كيت على الآتي:

1) **حجرات مغلفة بالمستضد النوعي** للبروسيلا، وهو الغلاف الخارجي للبروسيلا المجهضـــة Purified B.abortus outer membrane Antigen Coated Wells، موزعـــة على(12) شريطاً وفي كل شريط يوجد (8) حجرات.

2) **المحلول الممدد للعينة IgG or IgM Sample Diluent:** عبوة واحدة تحوي (22) مل من المحلول جاهزة للاستخدام..

3) **المحلول الموقف للتفاعل Stop Solution:** عبوة واحدة (12) مل من حمض كلور المـــاء (2 ن) 2N HCL جاهزة للاستخدام.

4) **محلول الغسيل Washing Solution:** عبوة واحدة تحوي (50) مل من البفر الذي يجـــب تمديده (20) مرة ليصبح جاهزاً للاستخدام.

5) .**المحلول الـــرابط HRP-anti-human IgG or IgM conjugate** : عبـــوة واحـــدة تحوي (12) مل من الأضداد المضادة للغلوبيولين الإنساني موسومة بـــأنزيم البيروكســـيداز جاهزة للاستخدام.

6) **محلول الركيزة TMB Substrate Solution:** عبوة واحـــدة تحـــوي (12) مـــل مـــن tetramethylbenzidine جاهزة للاستخدام.

7) **الكونترول الإيجابي** Brucella IgG or IgM positive control : عبوة واحدة تحـــوي (1.5) مل جاهزة للاستخدام.

8) **الكونترول المُعاير** Brucella IgG or IgM Cut-off Calibrator : عبوة واحدة تحـــوي (1.5) مل جاهزة للاستعمال.

9) **الكونترول السلبي** Brucella IgG or IgM Negative Control : عبوة واحدة تحـــوي (1.5) مل جاهزة للاستخدام.

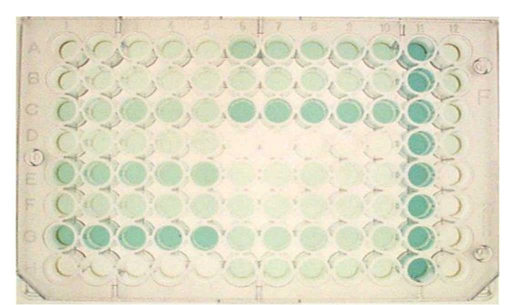
2-2-مبدأ التفاعـــل: تـــمّ الكشـــف عـــن الأضـــداد النوعيـــة للبروســـيلا فـــي مصـــل الإنســـان باستخدام Microtiter Strip Wells مغلفة بمستضدات نوعية لأضـــداد البروســـيلا IgG أو IgM حسب المواد المخبرية المستخدمة.

ففي الحالة الإيجابية، عند إضافة العيّنة إلى هذه الحجرة والحضن، يتّحدُ الضدُّ مع المستضـــدّ ليشكلا معاً معقداً لا يزول بالغسيل، ثم يُضافُ المحلولُ الرابط Conjugate وهـــو أضـــداد إنســـانيّة مضادّة لأضداد البروسيلا، موسومة بأنزيم البيروكسيداز.

وفي هذه الحالة الإيجابية تتّحدُ هذه الأضداد مع أضداد البروســـيلا الموجـــودة فـــي العينـــة والمتحدة مع المستضدّات المغلّفة لحجرة التفاعل. وبعد الحضن والغسيل يُضافُ محلـــولُ Substrate وهو الركيزة التي سيَعْمَلُ عليها أنزيمُ البيروكسيداز. في هذه الحالة الإيجابية يتفاعلُ الأنزيمُ مع

ركيزته لينتجَ تفاعلاً لونيّاً أزرقَ، تتناسبُ شدّته طرداً مع تركيز أضداد البروسيلا في العيّنة. وبعد الحضن يُضافُ محلولُ Stop solution الذي يوقف التفاعلَ معطياً لوناً أصفرَ، تُقـــاسُ شـــدّتُه الضوئية باستخدام قارئ جهاز الإليزا عند طول الموجة 450 نانو متر.





Indirect ELISA

1. Antigen/sample is added to plate.
2. Blocking buffer is added to block remaining protein-binding sites.
3. Next a suitable ***primary antibody*** is added.
4. A suitable ***secondary antibody – HRPO conjugate*** is then added which recognizes and binds to the primary antibody.
5. TMB substrate *(Leinco Prod. No. T118)* is added and is converted by HRPO to detectable form.

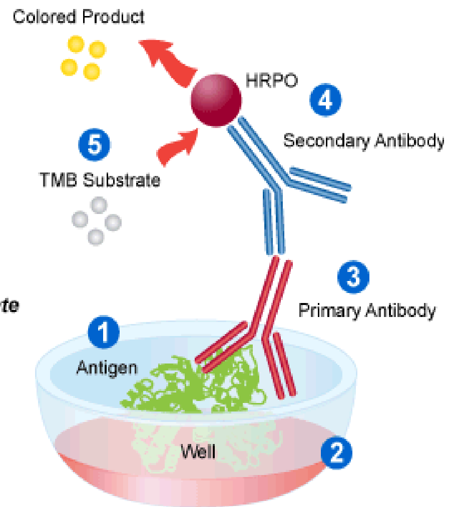


Diagram 1: *Illustration of Indirect ELISA method.*

2-3-طريقة العمل:

1) يجب إخراج جميع الكواشف و العيّنات ووضعها في درجة حرارة الغرفة قبل البدء بالعمل

2) يمكن استخدام المصل أو البلازما بوجود مانعِ تخثّرٍ.

3) تحتفظ العيّنات في درجة حرارة (-70 → -20) ويجب مزج العيّنات جيّداً مع تجنّب إعادة التجميد أكثر من مرّة.

4) قبل البدء بالعمل يجب تمديد جميع العيّنات بنسبة 1/21 عند التحري عن IgG أو IgM وذلك بإضافة 10 ميكرونات من العينة إلى 200 ميكرون من المحلول الممدد IgG/IgM sample Diluent.

الكنترول الإيجابي والسلبي لا يحتاجان إلى التمديد (يكونان جاهزين للاستخدام).

5) نختار العدد الذي نحتاجه من الحجرات ونُدخلها إلى الحامل (wells or microtiter strips).

6) على الأقل يجب تحديد:

أ) الحجرتان B+A من أجل الكونترول السلبي.

ب) الحجرتان C+D من أجل الكنترول الإيجابي.

ت) الحجرتان E+F من أجل Cut –off calibrator.

ث) الحجرة G من أجل الـــ blank .

7) نضع كمية 100 ميكرون من الكنترول والعيّنات الممدّة في الحجرات المناسبة لها ونترك حجرة E1 من أجل الـــ blank

8) نهزّ الصفيحة بشكل أفقي عدّة مرّات لنزيل الفقاعات وليتمّ المزجُ بشكل جيّد.

9) نحضن مدّة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة عند التحري عن IgM أو IgG

10) بعد انتهاء الحضن نغسل كلَّ حجرة ثلاث مرّات بـــ 300 ميكرون من محلول الغسيل وتُترَكُ الحجرة منقوعة بين كلِّ غسل و آخر مدّة أكثر من 5 ثوان. وفي النهاية يُزالُ السائلُ المتبقي by tapping strips

11) نضيف 100 ميكرون من **HRP-anti-human IgG or IgM conjugate** إلى جميع الحجرات.

12) نحضن مدّة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة (لا تُعرّضُ العيّنات على ضوء الشمس المباشر).

13) بعد انتهاء الحضن نغسل كلّ حجرة ثلاث مرات بـــ 300 ميكرون من محلول الغسيل وتترك الحجرة منقوعة بين كلّ غسل و آخر مدة أكثر من 5 ثوان. وفي النهاية يتم إزالة

السائل المتبقي by tapping strips

14) نضيف 100 ميكرون من TMB substrate solution إلى كلّ الحجرات.

15) نحضن مدّة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

16) نضيف 100 ميكرون من stop solution إلى كلّ الحجرات بنفس الترتيب لإضافة TMB substrate solution .

17) نقيس الامتصاصية للعينات بطول موجة 450 nm .

2-4-القياس:

1) يضبط قارئ جهاز الإليزا على الصفر باستخدام Reagent blank في الحجرة E1.

2)نقيس امتصاصية كل الحجرات في طول الموجة 450 nm ونسجل قيم الامتصاصية لكل كنترول و لكل عينة على الورقة الخاصة .

2-5 معايير ضبط الجودة : من أجل الــ IgM أو الــ IgG :

1) امتصاصية الكنترول السلبي < 0.9.

2) امتصاصية الكنترول الايجابي (R=2.1-3.9).

3) امتصاصية Cut –off calibrator (R= 0.35).

2-6- تفسير النتائج : يُحسب منسوب الأضداد **(Antibody Index)** بتقسيم امتصاصية العينة على امتصاصية الــ **Cut –off value** كما يلي:

$$\textbf{Antibody Index} = \frac{\textbf{Specimen OD}}{\textbf{Cut –off value}}$$

حيث:

Cut off value = Calibrator Factor(CF) × Calibrator OD

وتفسّرُ النتائج كما يلي :

العينة	**Antibody Index (منسوب الأضداد)**
الإيجابية	1.1 <
السلبية	0,90 <

تُعَدُّ العيّنات إيجابية إذا كان منسوب الأضداد فيها أكبر من 1.1، وتُعَدُّ العيّنات سلبية إذا كان منسوب أضدادها أقل من 0,90.

2-7- ملخّصُ طريقة العمل:

العيّنة تمديد 1/21	**Cut-off control**	**كنترول إيجابي**	**كنترول سلبي**	**Reagent blank**	
–	–	–	100 ميكرون	–	**كنترول سلبي**
–	–	100 ميكرون	–	–	**كنترول إيجابي**
–	100 ميكرون	–	–	–	**Cut-off control**
100 ميكرون	–	–	–	–	**العينة الممددة**
نحضن مدّة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة (IgM / IgG) ثم نغسل كلَّ حجرة ثلاث مرّات بـــ 300 ميكرون من محلول الغسيل.					
100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	–	**Conjugate**
نحضن مدّة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة (IgM / IgG) ثم نغسل كلَّ حجرةٍ ثلاث مرّات بـــ 300 ميكرون من محلول الغسيل.					
100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	**TMB Substrate**
نحضن مدّة عشر دقائق في درجة حرارة الغرفة					
100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	100 ميكرون	**Stop solution**

الفصل الرابع

الطرائق الإحصائية المستخدمة في تقييم النتائج

تمَّ تحليل النتائج إحصائياً باستخدام برنامج (SPSS) Chi square test وقد عُدَّتْ قيمةُ الـــ P value < 0.05 ذات دلالة إحصائية .

1- اختبار P: يدلُّ هذا الاختبار على احتمال كون العلاقة المُلاحَظَةُ ما بين المتحولين المدروسين ناجمةً عن تأثير الصُّدْفَةِ فقط؛ فوجود أهمية إحصائية أي $P<0.05$ تعني أنّ الصُّدْفَةَ غير محتملة كسبب للعلاقة بين المتحولين، وإنَّ عدم وجود أهمية إحصائية تعني أنّ الصُّدْفَة لا يمكن استبعادها كسبب مفسّر للعلاقة و لكنها لا تنفي وجود حالة السبب والنتيجة .

2- بعضُ القوانين الإحصائية المستخدمة:

2-1- المتوسط الحسابي Mean: و هو حاصل قسمة مجموع القياسات على عددها.

$$X = \frac{\sum Xi}{n}$$

2-2- الانحراف المعياري Standard Deviation: هو الجذر التربيعي الموجب لحاصل قســـمة مجموع مربعات انحرافات قيم المفردات الظاهرة المدروسة عن وســـطها الحســـابي X علـــى عـــدد مفردات الظاهرة n.

$$S.D = \frac{\sqrt{\sum (Xi - X)^2}}{n}$$

و هو معيار يدلُّ على مدى الانتشار لمجموعة البيانات حول المقـــدار الوســـطي لهـــا، فكلمـــا كـــان الانحراف المعياري كبيراً دلَّ ذلك على اتساع الاختلاف في البيانات.

اختبار كاي مربع Chi-Square Test (x^2) أُجري هذا الاختبار لدراسة االفروق بين نتائج الإليـــزا واختبار التراصّ على شريحة، و تُعَدُّ الاختلافات مهمّةً عندما تكون p الاحتمالية أقل من 0.05.

الباب الثالث

النتائج

الفصل الأول: عيّنة الدراسة

الفصل الثاني: دراسة العلاقات بين الاختبارات المصلية

الفصل الثالث: المناقشة

التوصيات

الخلاصة

الفصل الأول

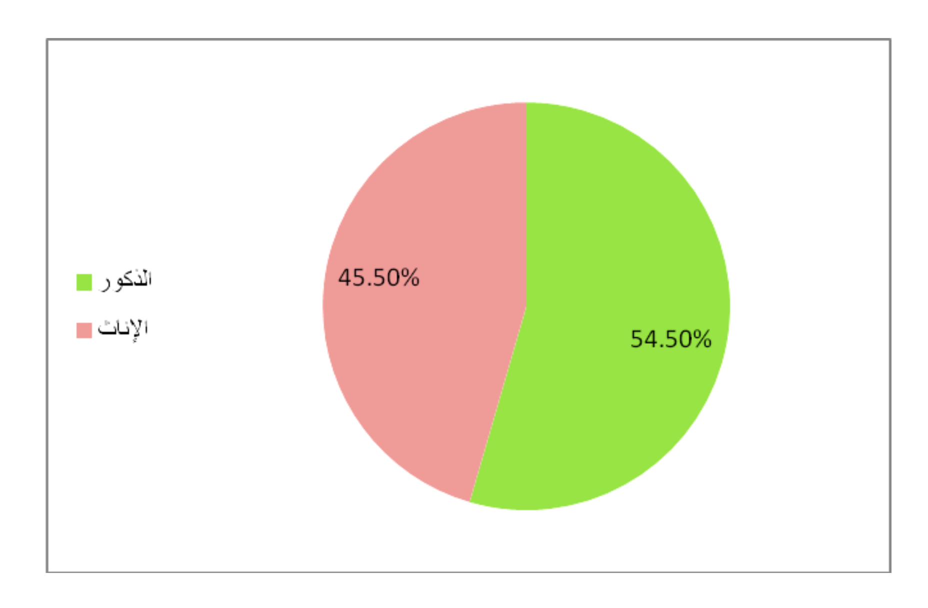
عينة الدراسة

شملت الدراسة (108) مرضى مشكوك بإصابتهم بالحمى المتموجة من مراجعي مشفى حلب الجامعي، وقد شُخِّص المرض عند (89) مريضاً منهم.

1-**الجنس:** تَوزَّعَ مرضى الحمّى المتموّجة حسب الجنس على نحو متقارب؛ فقد بلغ عدد الذكور (49) ذكراً (54.5%) مقابل (40) أنثى (45.5%). والجدول رقم (1) يوضّح توزُّعَ مرضى الحمّى المتموّجة حسب الجنس:

التوزّع حسب الجنس	الإناث	الذكور	
عدد الحالات	40	49	89
النسبة المئوية (%)	45.5	54.5	100

الجدول رقم (1)



الشكل رقم (1) توزُّع مرضى الحمّى المتموّجة وفق الجنس

2-العمر: تراوحت أعمار مرضى الحمّى المتموّجة في العينة المدروسة بين 2- 70 سنة، مع متوسّط عمر 24.38 ± 17.59 سنة، وتم توزيعهم إلى فئات عمرية مدّة كلّ فئة 13 سنة كالتالي:

1) المجموعة الأولى: [2- 15] سنة 39 مريضاً (43.8%).

2) المجموعة الثانية: [16- 29] سنة 9 مرضى (10.1%)

3) المجموعة الثالثة: [30- 43] سنة 32 مريضاً (36%).

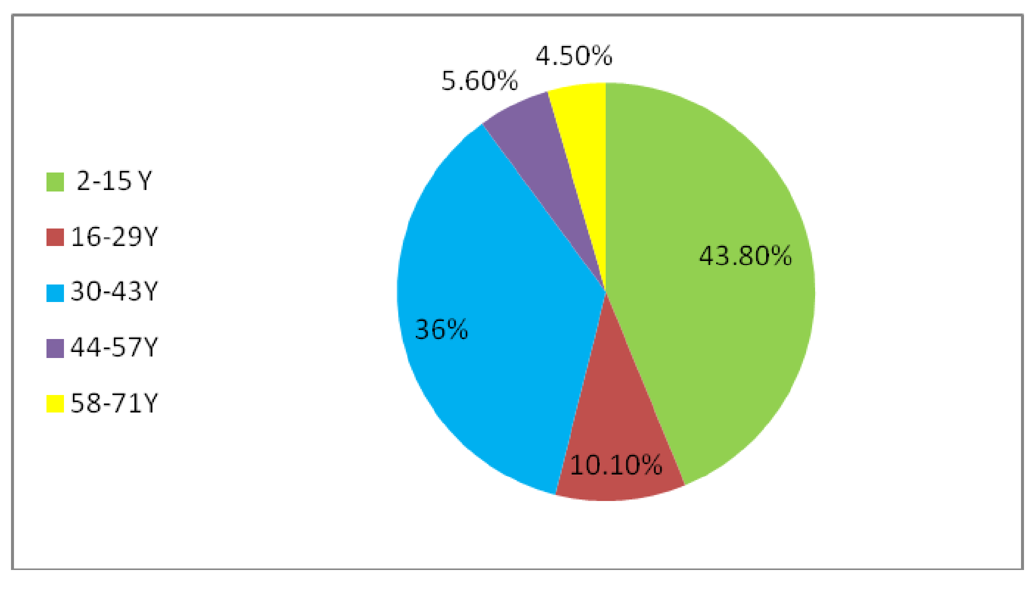
4) المجموعة الرابعة: [44- 57] سنة 5 مرضى (5.6%).

5) المجموعة الخامسة: [58- 71] سنة 4 مرضى (4.5%).

والجدول رقم (2) يوضح توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق العمر:

التوزّع وفق العمر	[2- 15] سنة	[13- 29] سنة	[30- 43] سنة	[44- 57] سنة	[58- 71] سنة	
عدد الحالات	39	9	32	5	4	89
النسبة المئوية (%)	43.8	10.1	36	5	4	100

الجدول رقم (2)

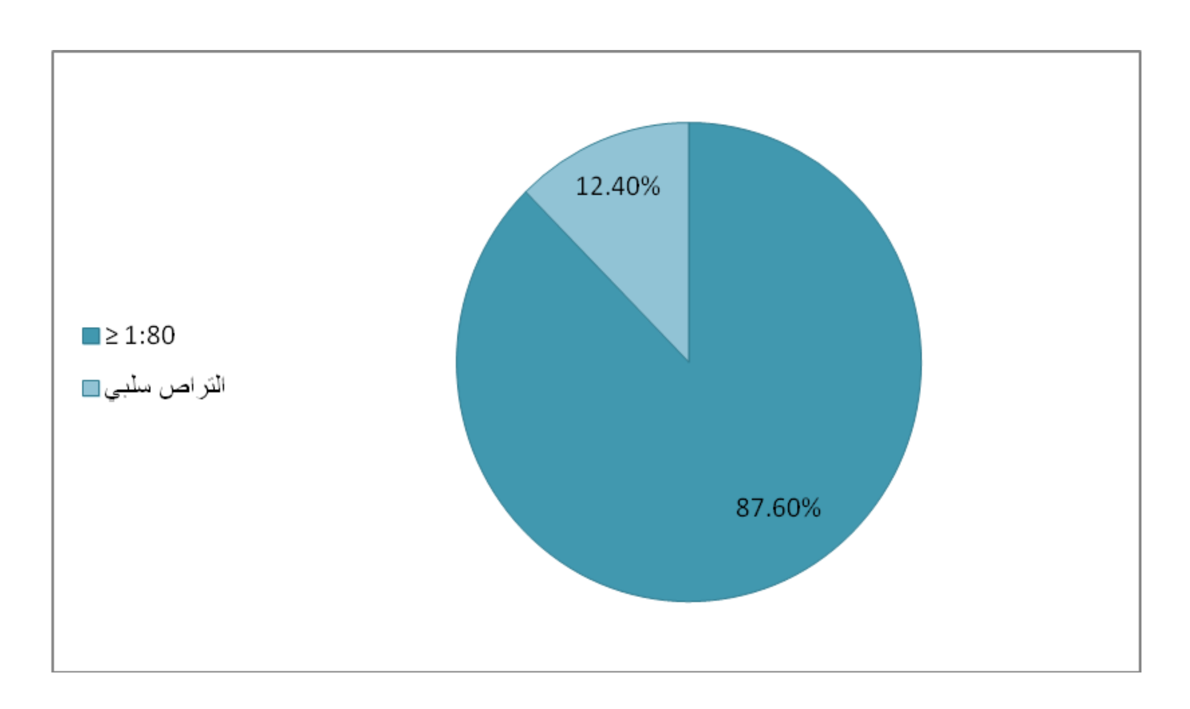


الشكل رقم (2) توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق العمر

3-اختبار التراصّ السريع على شريحة (اختبار رايت): توزَّعَ مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار التراصّ على شريحة كالتالي: بلغ عدد الحالات الإيجابية (≤ 1:80): 78 مريضاً (87.6%)، منها 8 حالات فقط إيجابية التراصّ 1:80، وبلغ عددُ الحالات السلبية (> 1:80): 11 مريضاً (12.4%) والجدول رقم (3) يوضح توزّع مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار التراصّ ≤ 1:80:

التوزع وفق اختبار التراصّ	التراصّ إيجابي ≤ 1:80	التراصّ سلبي > 1:80
عدد الحالات	78	11
النسبة المئوية (%)	87.6	12.4

الجدول رقم (3)

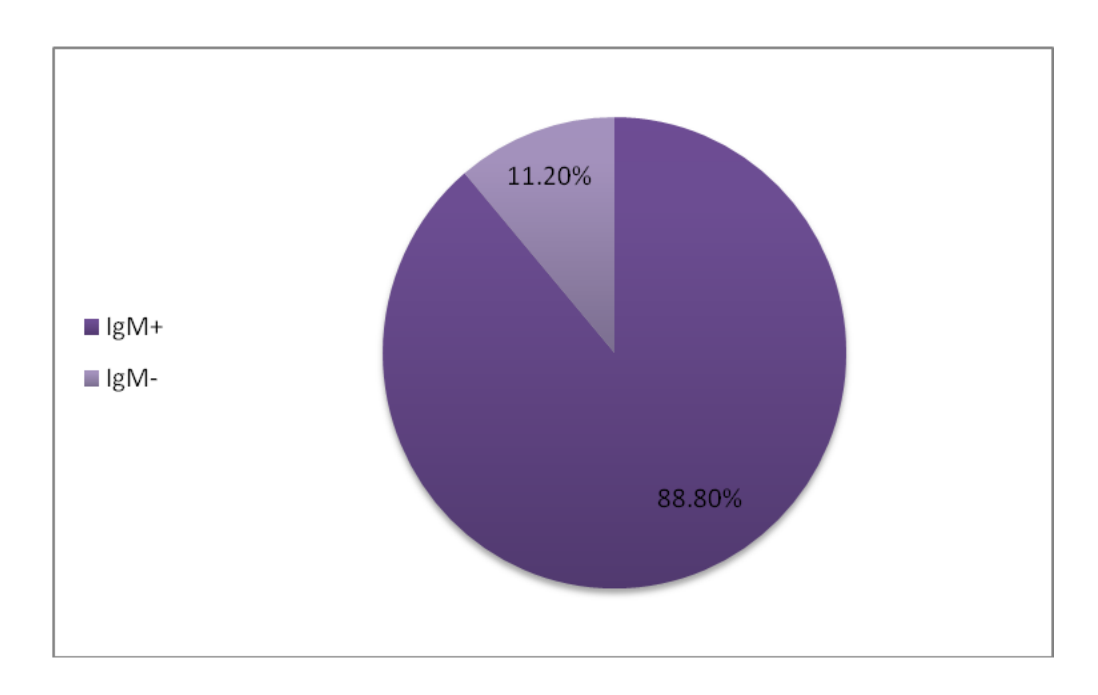


الشكل رقم (3) توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار التراصّ ≤ 1:80

4- اختبار المقايسة المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا IgM): توزّعَ مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgM كالتالي: بلغ عدد الحالات الإيجابية بالإليزا IgM: (79) مريضاً (88.8%)، وبلغ عدد الحالات السلبية بالإليزا IgM: (10) مرضى (11.2%). والجدول رقم (4) يوضّحُ توزّعَ مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgM:

التوزع وفق اختبار الإليزا IgM	الحالات إيجابية الـــ IgM	الحالات سلبية الـــ IgM
عدد الحالات	79	10
النسبة المئوية (%)	88.8	11.2

الجدول رقم (4)



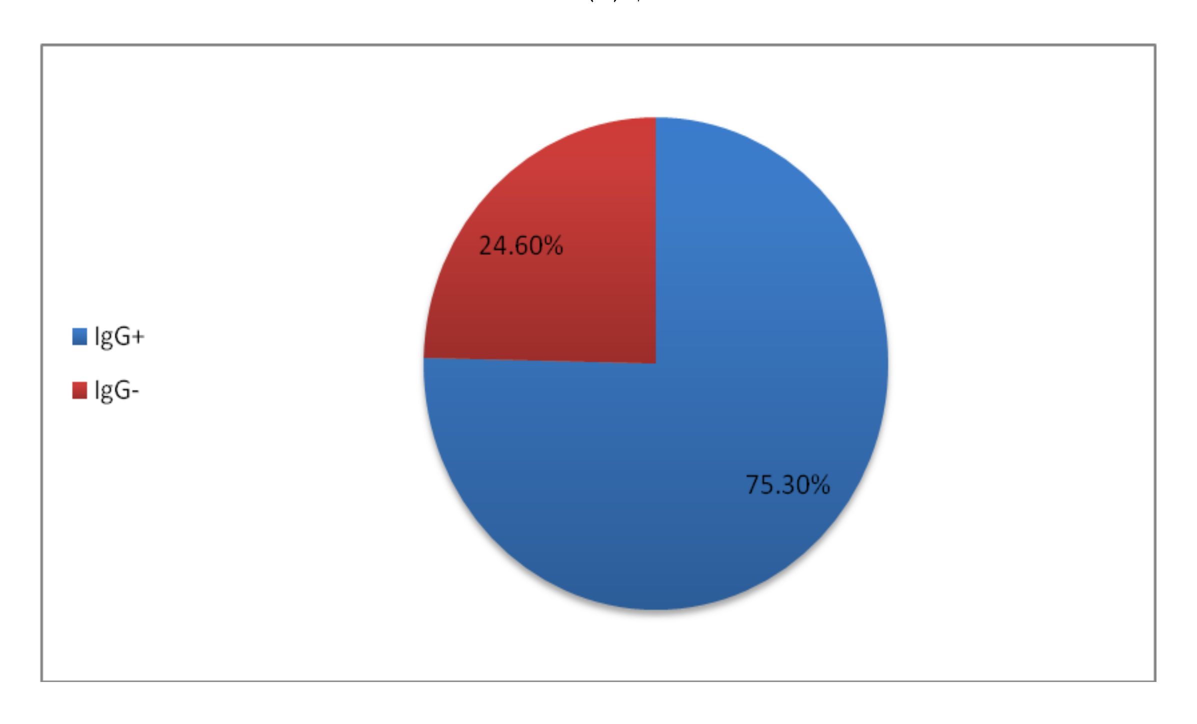
الشكل رقم (4) توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgM

5-اختبار المقايسة المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا IgG): توزَّعَ مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgG كالتالي : بلغ عددُ الحالات الإيجابية بالإليزا IgG: (67) مريضاً (75.3%)، وبلغ عدد الحالات السلبية بالإليزا IgG: (22) مريضاً (24.7%).

و الجدول رقم (5) يوضح توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgG :

التوزع وفق اختبار الإليزا IgG	الحالات إيجابية الـــ IgG	الحالات سلبية الـــ IgG
عدد الحالات	67	22
النسبة المئوية (%)	75.3	24.7

الجدول رقم (5)



الشكل رقم (5) توزع مرضى الحمّى المتموّجة وفق اختبار الإليزا IgG

6-النسب المئوية الإيجابية للاختبارات المصلية المستخدمة: كُشِفَتْ الإيجابية المصلية للحمى المتموّجة في (89) مريضاً من العيّنة المدروسة، على النحو التالي:

1)- عدد الحالات إيجابية التراصّ ≤ 1:80: (78) مريضاً (87.6%).

2)- عدد الحالات إيجابية الإليزا IgM: (79) مريضاً (88.8%).

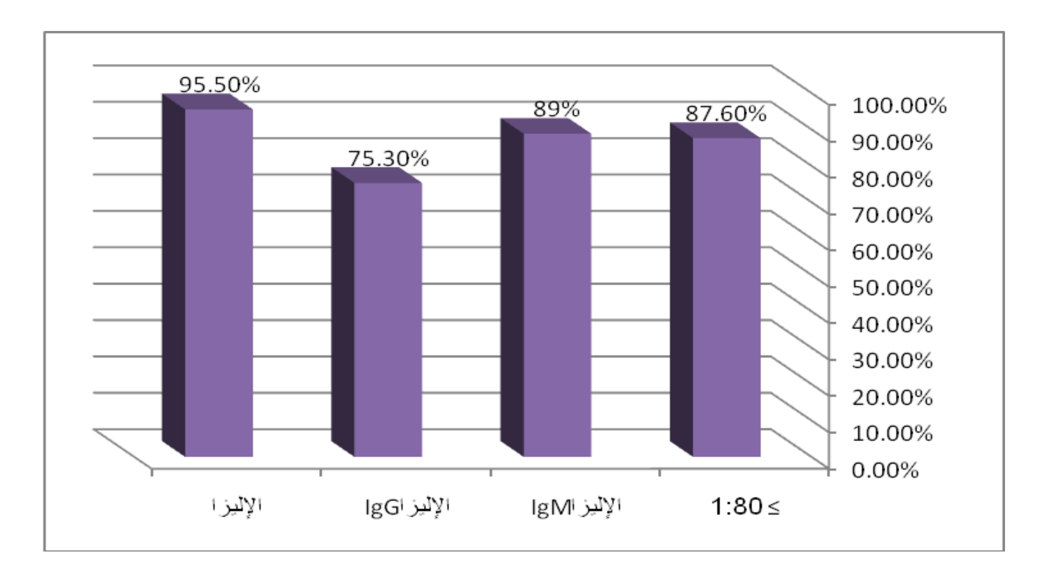
3)- عدد الحالات إيجابية الإليزا IgG: (67) مريضاً (75.3%).

4)- عدد الحالات إيجابية الإليزا: (85) مريضاً (95.5%).

والجدول رقم (6) يوضح النسب المئوية الإيجابية للاختبارات التي استُخدِمَت في تشخيص الحمّى المتموّجة في هذه الدراسة:

الاختبار المستخدم	العدد الكلي للحالات المشخصة 89 مريضاً(النسبة المئوية للإيجابية)
التراصّ على شريحة ≤ 1:80	78 مريضاً (87.6%)
الإليزا IgM	79 مريضاً (88.8%)
الإليزا IgG	67 مريضاً (75.3%)
الإليزا	85 مريضاً (95.5%)

الجدول رقم (6)



الشكل رقم (6) يوضح النسب المئوية الإيجابية للاختبارات المصلية المستخدمة

7-عيارات اختبار التراصّ وعدد حالاتها في العينة المدروسة: توزّعَ عينة الدراسة وفق عيارات التراصّ كالتالي:

1)- عدد الحالات سلبية التراصّ (< 1:80): (30) حالة، كان منها 6 حالات ذات عيار 1:20، و9 حالات ذات عيار 1:40، و15 حالة سلبية التراص والتحوصب في أي عيار).

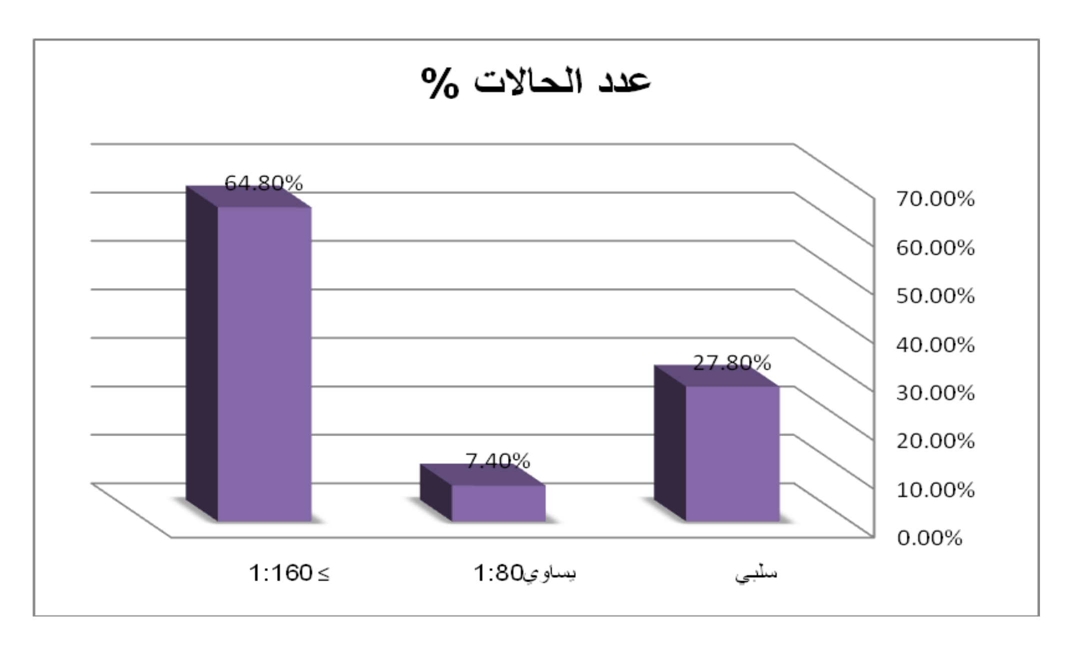
2)- عدد الحالات إيجابية التراص (1:80): (8) حالات.

3)- عدد الحالات إيجابية التراصّ (≤ 1:160): (70) حالة.

أي أنَّ الأغلبية العظمى من المرضى الذين يعانون من أعراض وعلامات المرض يمتلكون العيار ≤ 1:160 (89.7%) وخاصة العيار 1:160 ، 1:320، وهذا يتماشى مع أنَّ العيار ≤ 1:160 يترافق مع الحالات الحادة والتي تمثل أغلبية مرضى الحمى المتموجة في هذه الدراسة. والجدول رقم (7) يوضّح عياراتِ التراصّ وعددَ حالات كلِّ عيارٍ:

عيارات التراصّ	عدد الحالات (%)
سلبي (< 1:80)	30 (27.8)
1:80	8 (7.4)
≤ 1:160	70 (64.8)

الجدول رقم (7)



الشكل رقم (7) يوضح توزع عينة الدراسة وفق عيارات اختبار التراصّ

الفصل الثاني

دراسة العلاقات بين الاختبارات المصلية

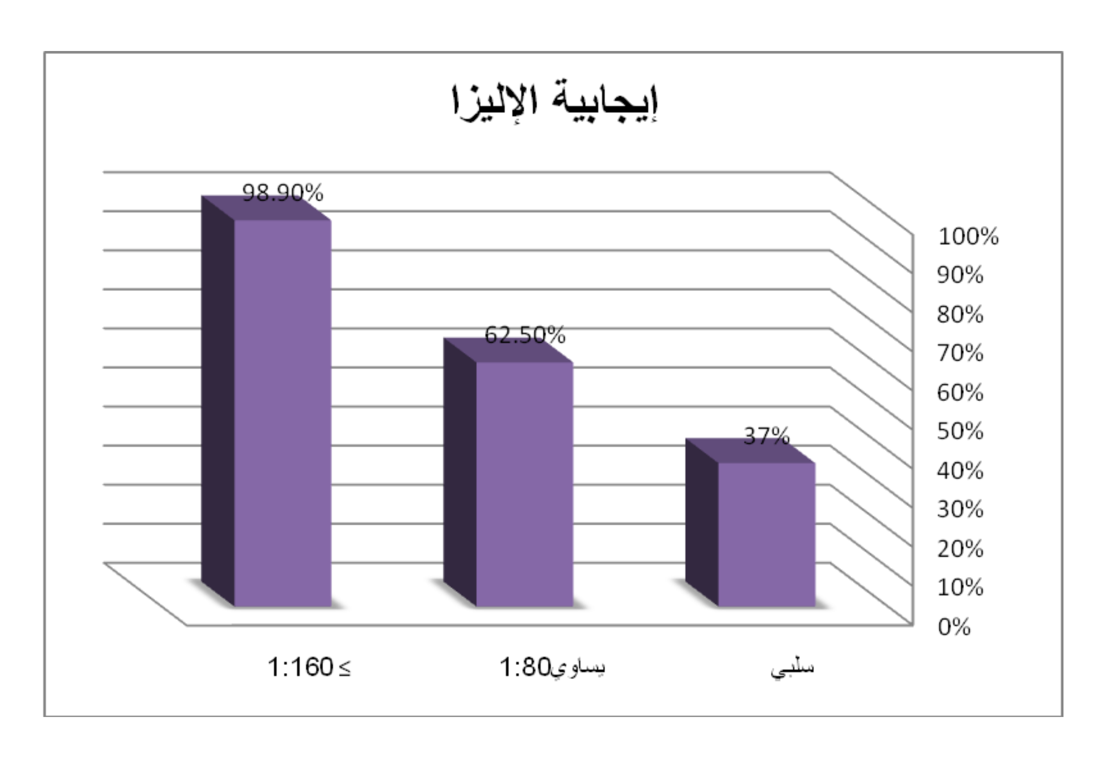
1- دراسة العلاقة بين اختبار التراصّ على شريحة والنتائج الإيجابية للإليزا في جميع مرضى الدراسة (108 مريضاً): بلغ عدد الحالات سلبية التراصّ:30 حالة (27.8%)، وبلغ عدد الحالات إيجابية التراصّ (1:80): 8 حالات (7.4%)، كما بلغ عدد الحالات إيجابية التراصّ ≤ 1:160: 70 حالة (64.8%).

وقد كانت الإليزا إيجابية في 11 حالة من الحالات سلبية التراصّ < 1:80(36.7%) [3 حالات ذات عيار 1:20 و3 حالات ذات عيار 1:40 و5 حالات سلبية التراص في أي عيار]، كما كانت الإليزا إيجابية في 5 حالات إيجابية التراصّ 1:80 (62.5%)، وكانت الإليزا إيجابية في 69 حالة إيجابية التراصّ ≤ 1:160 (98.6%).

والجدول رقم (8) يوضح العلاقة بين اختبار التراصّ و الإليزا في العينة المدروسة:

عيار التراصّ (عدد الحالات)	إيجابية الإليزا (IgM و IgG)	النسب المئوية للإليزا الإيجابية
السلبي (30)	11	%36.7
1:80 (8)	5	%62.5
≤ 1:160 (70)	69	%98.6

الجدول رقم (8)



الشكل رقم (8) يوضح العلاقة بين اختبار الإليزا والتراصّ في العينة المدروسة

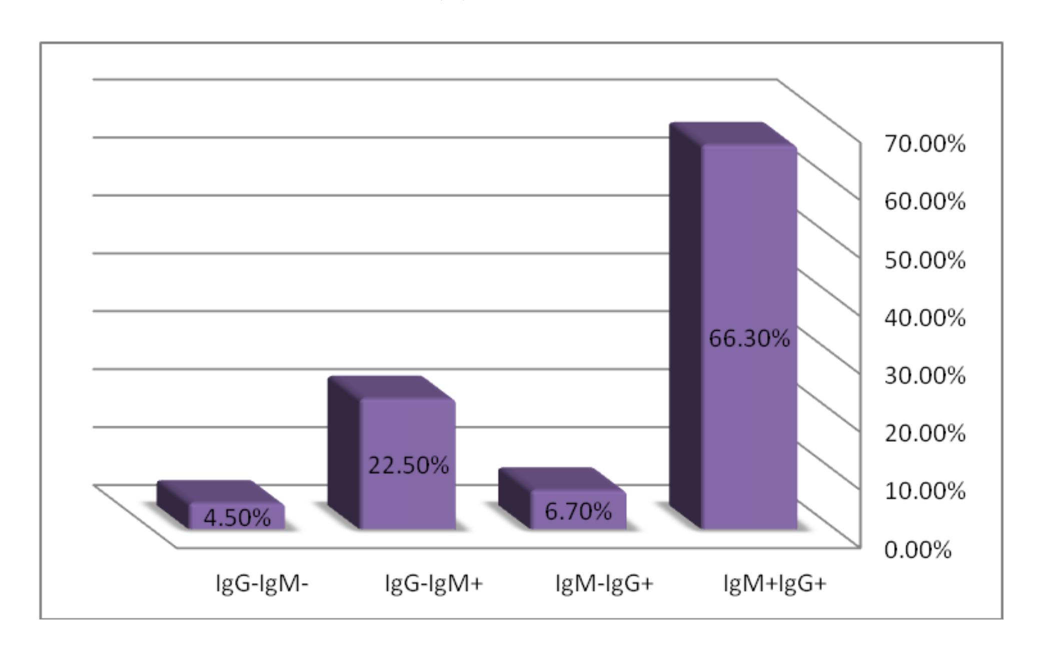
نلاحظ من المخطط ارتفاع نسبة إيجابية الإليزا في الحالات إيجابية التـــراص ≤ 1:160 (98.9%) مقارنة بالحالات إيجابية التراص 1:80 (62.5%). أي أنّ نسبة توافق إيجابية الإليزا مع إيجابيـــة التراص ≤ 1:160 كانت: (98.9%). ولأن العيارات الغالبة في هـــذه الدراســـة هـــي العيـــارات ≤ 1:160 فهذا يتوافق أيضاً مع أنَّ المرض الحاد أكثر ترافقاً مع العيارات ≤ 1:160.(بما أنَّ معظـــم مرضى الدراسة يشكون من المرض الحاد).

أُجري اختبار كاي مربع (x^2) لتحليل البيانات، لبيان وجود علاقة بين نتائج اختبار الإليزا، ونتائج اختبار التراص على شريحة فكانت قيمة p=0.001 (< 0.05) أي أنه يوجد ارتباط إحصائي مهم بين نتائج الإليزا و التراص على شريحة.

2- دراسة العلاقة بين الإليزا IgM والإليزا IgG في المرضى المُشَخّصين: كان اختبار الإليزا IgM و IgG إيجابياً في(59) مريضاً من أصل(89) مريضاً (66.3%)، وكان اختبـــار الإليـــزا IgG إيجابياً والـــ IgM سلبياً في (6) مرضى من أصل (89) مريضاً (6.7%)، كما كـــان اختبـــار الإليزا IgG سلبياً والـــ IgM إيجابياً في (20) مريضاً من أصل (89) مريضا (22.5%). وكان اختبار الإليزا IgG و IgM سلبياً في (4) مرضى(4.5%). والجدول رقم (9) يوضح العلاقة بـــين الإليزا IgM و الإليزا IgG في مرضى الحمّى المتموّجة:

العلاقة بين IgG و IgM	IgG ايجابي IgM ايجابي	IgG ايجابي IgM سلبي	IgG سلبي IgM ايجابي	IgG سلبي IgM سلبي	المجموع
العدد	59	6	20	4	89
النسبة المئوية (%)	66.3	6.7	22.5	4.5	100

الجدول رقم (9)



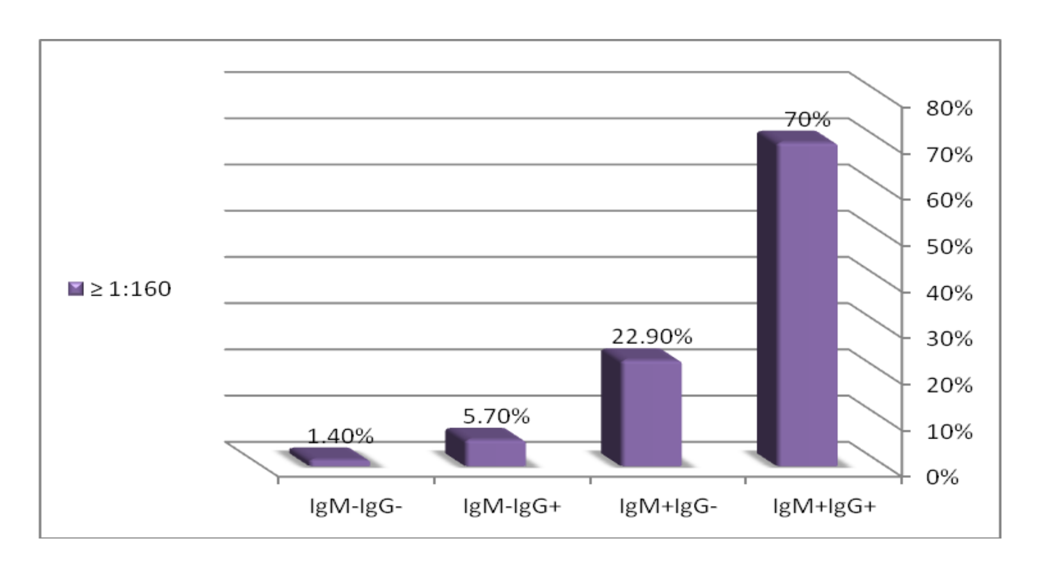
الشكل رقم (9) يوضح العلاقة بين اختبار الإليزا IgM و IgG

ونلاحظ من المخطط أنَّ الحالات إيجابية IgM و IgG تشكل النسبة الأكبر من الحالات إيجابية الإليزا(66.3%)، تليها الحالات إيجابية الــ IgM لوحده (22.5%) وهذه النتائج تتوافق مع مرحلة المرض المسيطرة في هذه الدراسة وهي المرحلة الحادة (أقل من شهرين)، أي أن الإليزا استطاعت تحديد مرحلة المرض بتحديدها لنوع الأضداد المسيطرة.

3-دراسة العلاقة بين التراصّ ≥ 1:160 والإليزا IgM والإليزا IgG في المرضى المُشَخّصين: كان التراصّ ≥ 1:160 إيجابياً و IgM إيجابياً و IgG إيجابياً في (49) مريضاً من أصل (70) مريضاً (70%)، وكان التراصّ ≥ 1:160 إيجابياً و IgM إيجابياً و IgG سلبياً في (16) مريضاً من أصــل (70) مريضاً (22.9%)،.وكان التراصّ ≥ 1:160 إيجابياً و IgM سلبياً و IgG إيجابيــاً فــي (4) مرضى من أصل (70) مريضاً (5.7%)، كما كان التراصّ ≥ 1:160 إيجابيــاً و IgM ســلبياً و IgG سلبياً في مريض واحد (1.4%). والجدول رقم (10) يوضح العلاقة بين اختبــار التــراصّ ≥ 1:160 و الإليزا IgM و IgG:

	IgM+IgG+		IgM+IgG-		IgM-IgG+		IgM-IgG-		المجموع
	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	
التراصّ ≥ 1:160إيجابي	49	70	16	22.9	4	5.7	1	1.4	70

الجدول رقم (10)



الشكل رقم (10) يوضح العلاقة بين التراصّ ≥ 1:160 و الإليزا IgM و IgG

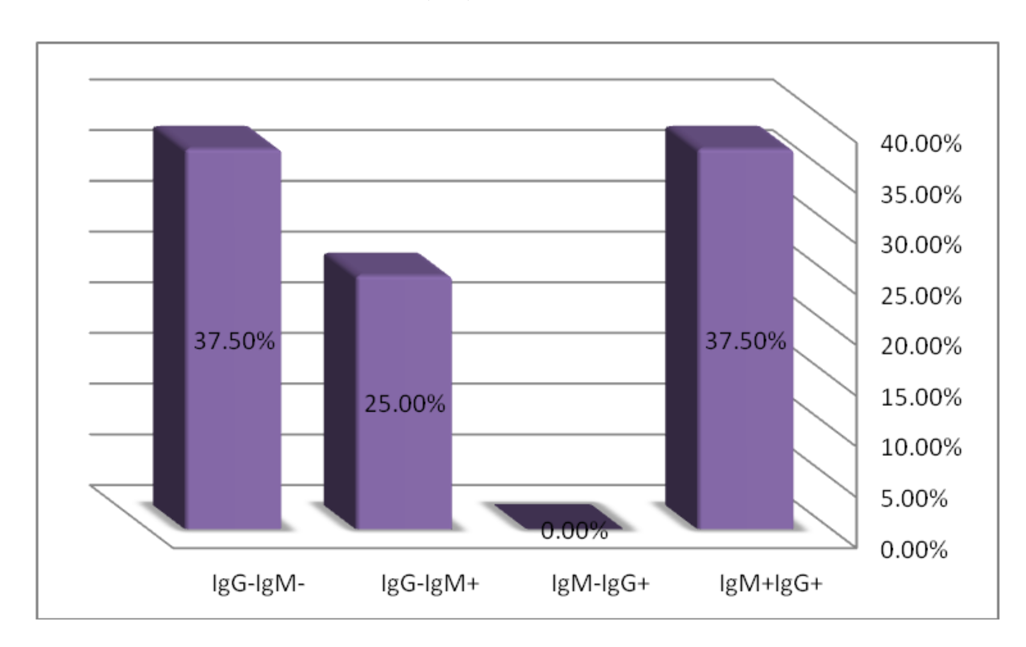
نلاحظ من المخطط أنَّ 92.9% من حالات التراص الإيجابية ≤ 1:160 كانت إيجابية الإليزا IgM وهذه النتائج تتوافق مع مرحلة المرض المسيطرة في هذه الدراسة وهي المرحلة الحادة (أقل من شهرين).

نلاحظ التوافق الكبير بين نتائج التراص ≤ 1:160 والإليزا في حالات المرض الحاد.

4- دراسة العلاقة بين التراصّ 1:80 والإليزا IgM والإليزا IgG في المرضى المُشَخّصين: كان التراصّ 1:80 إيجابياً و IgM إيجابياً و IgG إيجابياً في(3) مرضى من أصل (8) مرضى (37.5%)، وكان التراصّ 1:80 إيجابياً و IgM إيجابياً و IgG سلبياً في مريضين من أصل (8) مرضى (25%)، كما كان التراصّ 1:80 إيجابياً و IgM سلبياً و IgG سلبياً في (3)مرضى من أصل (8) مرضى (37.5%). والجدول رقم (11) يوضح العلاقة بين اختبار التراصّ 1:80 والإليزا IgM و IgG:

	IgM+IgG+		IgM+IgG-		IgM-IgG+		IgM-IgG-		المجموع
	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	العدد	النسبة %	
التراصّ ≤ 1:80إيجابي	3	37.5	2	25	0	0	3	37.5	8

الجدول رقم (11)



الشكل رقم (11) يوضح العلاقة بين التراصّ 1:80 و الإليزا IgM و IgG

نلاحظ من المخطط أنّ جميع حالات التراص الإيجابية 1:80 كانت إيجابية الإليزا IgM وهذه النتائج تتوافق مع مرحلة المرض المسيطرة في هذه الدراسة وهي المرحلة الحادة (أقل من شهرين).

الفصل الثالث

المناقشة

1- مناقشة نتائج مرضى الدراسة الحالية: يحدث الإنتان بالبروسيلا في المناطق التي يشيع فيها التعامل مع الحيوانات أو التعرض لمنتجات هذه الحيوانات (شرب حليب الماعز والجمل أو البقر إضافة إلى تناول أجبانها دون غلي أو تعقيم. وقد لاحظنا في هذه الدراسة أن (21) مريضاً (23.5%) كانوا معَرَّضين مهنياً للمرض. وقد ذكر (53) مريضاً (59.6%) قصّة تعرّضٍ للعامل الممرض (البروسيلا)، مثل تناول منتجات الألبان من جبن وحليب ومثلجات، وكان عدد الحالات الحادة (أقل من شهرين) حسب رواية المرضى 81 حالة من بينهم (10) مرضى لم تتجاوز فترةُ شكايتهم الـــ10 أيام.

تمت هذه الدراسة بين شهري نيسان وأيلول من عام 2010 وشملت (108) مرضى مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموّجة، وشخّص المرض عند (89) مريضاً منهم.

كما تراوحت أعمار مرضى الحمّى المتموّجة في الدراسة الحالية بين (2–70) سنة مع متوسط عمر للعينة 24.38 ± 17.59سنة، وأُجري اختبار التراصّ على شريحة، واختبار الإليزا غير المباشرة IgG , IgM على جميع مرضى الدراسة.

وتمّ حساب نسبة إيجابية اختبار التراصّ على شريحة ≤ 1:160 ، التراصّ على شريحة ≤ 1:80 ، الإليزا IgG والإليزا IgM عند مرضى الحمّى المتموّجة، حيث كان التراصّ ≤ 1:160 إيجابياً بنسبة 78.7%، وكان التراصّ ≤ 1:80 إيجابياً بنسبة 87.6%، وكانت الإليزا IgG إيجابية بنسبة 75.3%، والإليزا IgM إيجابية بنسبة 88.8%، كما كانت الإليزا إيجابية في 11 حالة سلبية التراص (36.7%)، وكانت الإليزا إيجابية في 5 حالات إيجابية التراصّ 1:80 (62.5%)، و كانت الإليزا إيجابية في (69) حالة إيجابية التراصّ ≤ 1:160 (98.6%).

بلغ عددُ الحالات سلبية الإليزا وإيجابية التراصّ ≤ 1:80 (4) حالات: (3) حالات إيجابية التراصّ 1:80 ، وحالة واحدة إيجابية التراصّ 1:160.

ومن أجل تحديد القيمة التشخيصية للإليزا قمتُ بمقارنة الحساسية بينها وبين التراصّ على شريحة؛ فكان التراصّ ≤ 1:160 إيجابياً بنسبة 78.7%، وكان التراصّ ≤ 1:80 إيجابياً بنسبة

87.6%، وكانت الإليزا IgM إيجابية بنسبة 88.8%، وكانت الإليزا IgG إيجابية بنسبة: 75.3%. ولدى دراسة العلاقة بين الإليزا IgM و الإليزا IgG تبين أنّ عدد الحالات الحادة التي كشفتها الإليزا (والتي تتماشى مع إيجابية الــ IgM لوحده أو إيجابية الــ IgM و الــ IgG معاً) بلغ 79 حالة (88.8%) وهذا يتوافق مع المرحلة المرضية التي يعاني منها هؤلاء المرضى وهي المرحلة الحادة (أقل من شهرين).

ولدى دراسة العلاقة بين IgM وIgG والتراصّ الإيجابي ≤ 1:160 تبين لنا أنّ عدد الحالات إيجابية الإليزا IgM عند الذين أظهروا تراصاً إيجابياً ≤ 1:160 كان (65) مريضاً من أصل (70) مريضاً (92.9%) و هذا يدلّ على التوافق الكبير بين النتائج الإيجابية للإليزا (IgM ، IgM+IgG) و التراصّ (≤ 1:160) في تشخيص المرض الحادّ الفعّال، ويدلّ أيضاً على توافق نتائج الإليزا هنا مع قصّة المرض الحادّ التي يشكو منها هؤلاء المرضى.

كما كان التراصّ إيجابياً ≤ 1:160 والــ IgG إيجابياً في (4) حالات (5.7%) وهذا قد يدلّ على المرض المزمن الفعّال، أي ثمّة توافق بين نوع الأضداد المسيطرة ومرحلة المرض التي تجاوزت ثلاثة أشهر عند هؤلاء المرضى، وكذلك على دلالة العيار ≤ 1:160 في تشخيص المرض.

وكانت الإليزا IgG و IgM إيجابية والتراصّ سلبياً في (8) مرضى (72.7%) وقد يكون السبب عائداً لأحد أسباب السلبية الكاذبة للتراصّ كالإنتان بالبروسيلا الكلبية أو الحالات المزمنة (الــ IgM قد تكون موجودة في 33% من الحالات المزمنة مترافقة مع الــ IgG حسب الكيت). وكان هناك حالة واحدة إيجابية الإليزا IgM وسلبية التراصّ (9.1%). وقد تكون هذه سلبية كاذبة على اعتبار أنّ أحد أسباب السلبية الكاذبة للتراصّ هو الأسبوع الأول من الإنتان.

كما لاحظنا أنّ الــ IgG كان إيجابياً على الرغم من سلبية التراصّ والــ IgM في مريضين(18.2%). وقد يعود السبب إلى الإزمان المتأخّر للمرض، والذي يتطابق مع قصة مرض منذ سنتين عند هذين المريضين وهذا ممّا أدى إلى حدوث السلبية الكاذبة في اختبار التراصّ لأنّ عيارات الأضداد بالتراصّ تكون منخفضة أو غائبة في الحالات المزمنة كما أنّ التراصّ يخفق عادة في تمييز الحالات القديمة والناكسة، حيث يُعد الــ IgG مؤشّراً جيداً على المرض الفعّال وأكثر من الــ IgM.

وقد كانت هناك (8) حالات إيجابية التراصّ 1:80 في العينة، وكانت نتائج الإليزا لــدى (5) منهم إيجابية (62.5%) وفق التوزّع التالي: الإليزا IgM و IgG إيجابية في (3) حالات (60%). والإليزا IgM إيجابية في (2) حالتين (40%).

وكانت الإليزا سلبية في (3) مرضى يملكون العيار 1:80 (37.5%) وكانت الإليزا سلبية عند مريض واحد يملك عياراً ≤ 1:160 (1.4%). وقد يعود السبب إلى الإيجابية الكاذبة للتراصّ.

وأصبحت نسبة إيجابية التراصّ مقارنة بالإليزا أعلى عند اعتبار العيار 1:80 مشخصاً ليصبح بذلك عددُ الحالات إيجابية التراصّ 78 (87.6%) مقابل عدد الحالات إيجابية الإليزا 87 (97.8%)، أي أن حساسية اختبار التراصّ مقارنة بالإليزا أصبحت أعلى عند انخفاض العيار المشخص.ولكن أظهر العيار≤ 1:160 توافقاً أكبر مع إيجابية الإليزا (98.6%) مقارنة مع العيار≤ 1:80(62.5%)

والنتيجة تدلّ على إمكانيّة أنْ نعدَّ العيار 1:80 ذا دلالة تشخيصية في تشخيص المرض ولا سيّما أنّ العيار 1:80 هو العيار المشخّص حسب الكيت، ولكن يبقى العيار ذو الدلالة التشخيصية الهامة والواضحة على المرض الفعال وخاصة الحاد هو العيار ≤ 1:160، طالما يترافق مع أعراض وعلامات المرض. ويمكن إيجاز نتائج المناقشة في النقاط التالية:

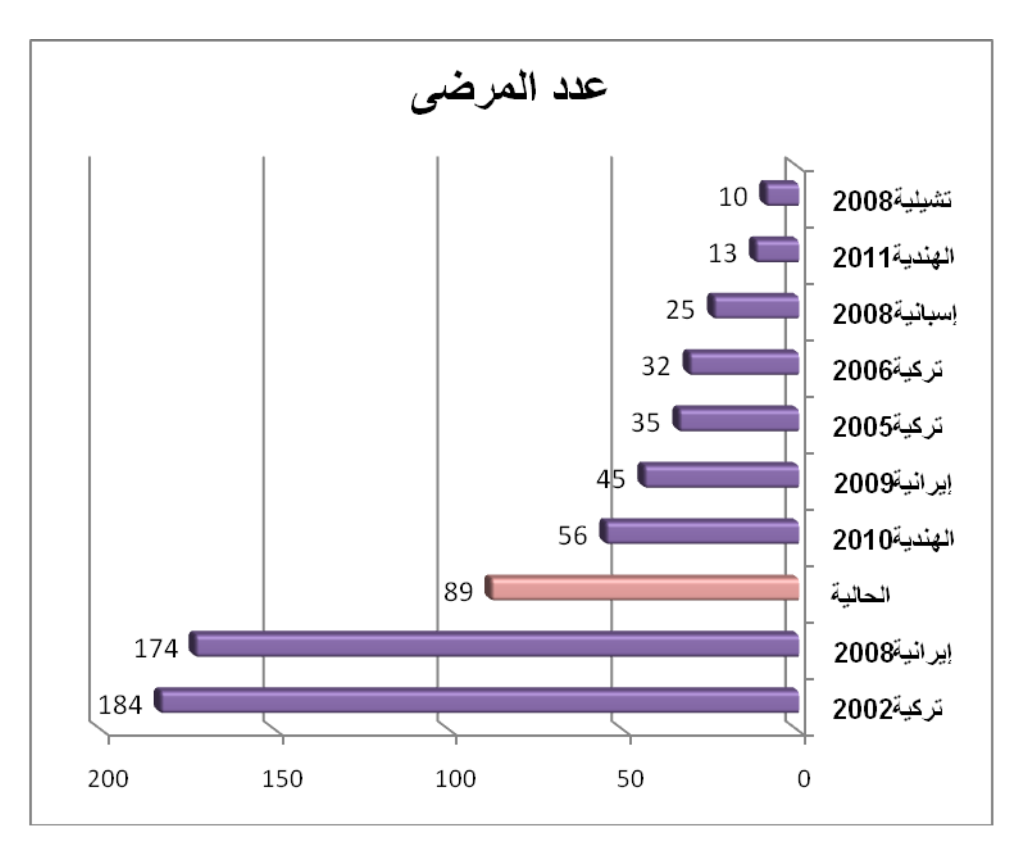
- استطاعت الإليزا كشف (11) حالة كانت سلبية التراصّ: تُعَدّ الإليزا الاختبار الأكثر حساسية مقارنة بالتراصّ على شريحة في كشف مرضى الحمّى المتموّجة.
- توافقت الإليزا في نتائجها مع مرحلة المرض حيث ترافقت الحالات الحادة مع إيجابية الـــ IgM لوحده أو مترافقاً مع الـــ IgG، وترافقت الحالات المزمنة مع كمية منخفضة أو غائبة من الـــ IgM مع ارتفاع في الـــ IgG. كما أنَّ الحالات الحادة إيجابية الإليزا IgM كانت إيجابية التراصّ ≤ 1:160 بنسبة (92.9%).
- تنتج عن المقارنة بين التراصّ والإليزا حساسيّةٌ عالية.

2- مقارنة نتائج هذه الدراسة بالدراسات العالمية:

الدراسة	عدد المرضى المشخصين	اختبار التراصّ ≤ 1:160	اختبار الإليزا %
الهندية (2011)	13	%30.8	(84.6) IgM (38.5) IgG
الهندية (2010)	56	%41	100
الإيرانية (2009)	45	%71.1	(40) IgM (97.8) IgG
الإسبانية(2008)	25	%100	(60) IgM (84) IgG
الإيرانية (2008)	174	%58.6	100
التشيلية (2008)	10	%70	(50) IgM (80) IgG
التركية (2006)	32	%93.8	(100) IgM (81.3) IgG
التركية (2005)	35	%94.3	(71.4) IgM (97.1) IgG
التركية (2002)	184	%83.7	(49.5) IgM (61.9) IgG
الحالية	89	%78.7	(88.8) IgM (75.3) IgG

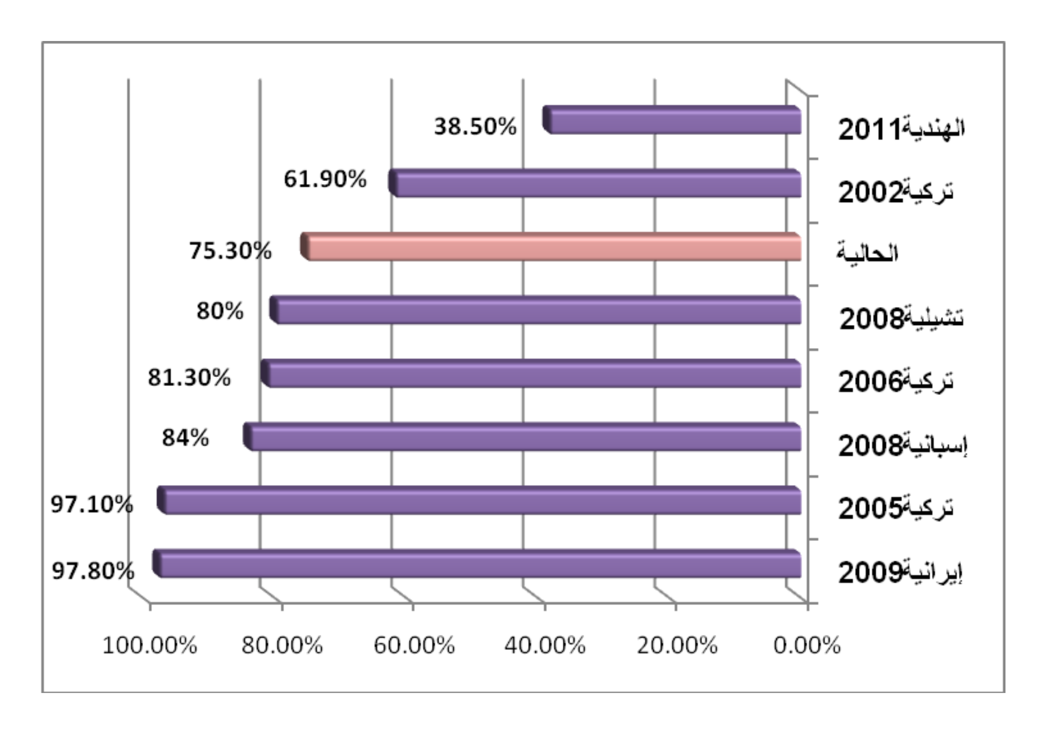
جدول رقم (12) مقارنة نتائج هذه الدراسة بالدراسات المقارنة

1-2 عدد العينات: لوحظ أنّ أكبر عدد عينات كان في الدراسة التركية 2002 والتي شملت (184) مريضاً، بينما كان أخفض عدد عينات في دراسة تشيلي 2008 والتي شملت على (10) مرضى. والمخطط التالي رقم (12) يوضح ذلك:



الشكل رقم (12)

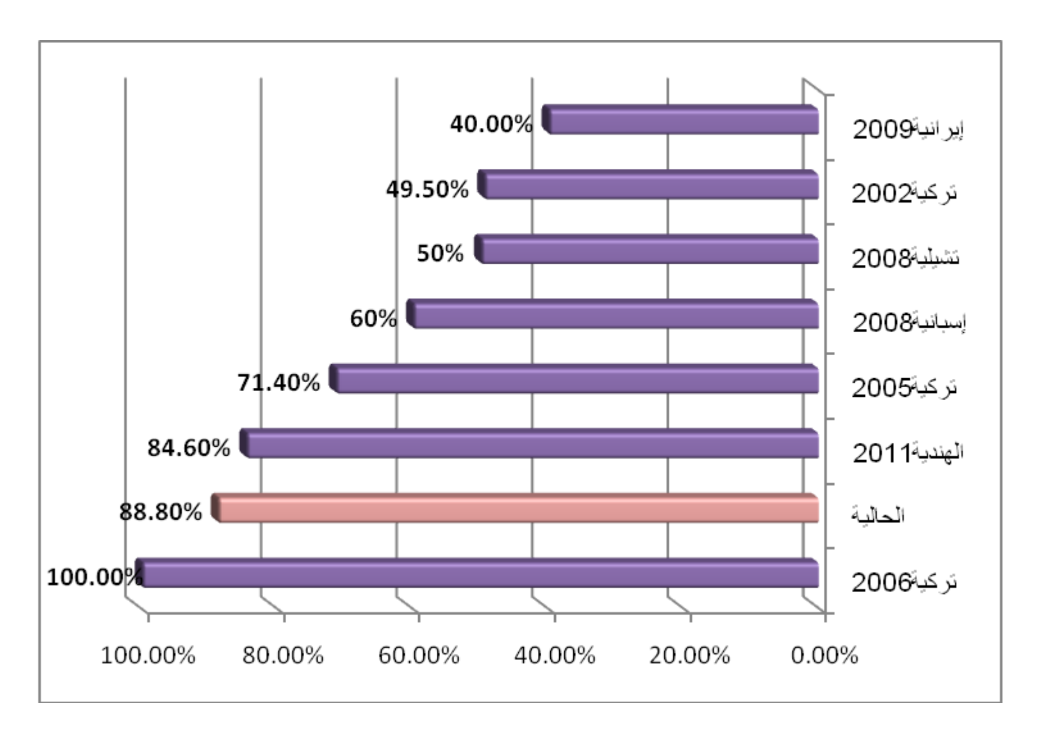
2-2- نسبة إيجابية IgG: لوحظ أنّ أعلى نسبة إيجابية لـــ IgG كان في الدراسة الإيرانية 2009 بنسبة 97,77% بينما كان أخفض نسبة إيجابية لـــ IgG في الدراسة الهندية 2011 بنسبة 38.5%. والمخطط التالي رقم (13) يوضح ذلك:



الشكل رقم (13)

نلاحظ من المخطط السابق أنّ نسبة إيجابية الإليزا IgG في هذه الدراسة متوافقة مع الدراسات التشيلية 2008 والإسبانية 2008 ومنخفضة مقارنة مع الدراسة التركية 2005 والإيرانية 2009 ومرتفعة مقارنة مع الدراسة الهندية 2011 والتركية.2002 وقد يعود سبب الاختلاف بين الدراسات إلى اختلاف الطرق المستخدمة بين الدول أو إلى اختلاف مرحلة المرض في الدراسات.

3-2- نسبة إيجابية IgM: لوحظ أنّ أعلى نسبة لـــ IgM كانت في الدراسة التركية 2002 بنسبة 100% بينما كانت أخفض نسبة لـــ IgM في الدراسة الإيرانية 2009 بنسبة 40% . والمخطط التالي رقم (14) يوضح ذلك:

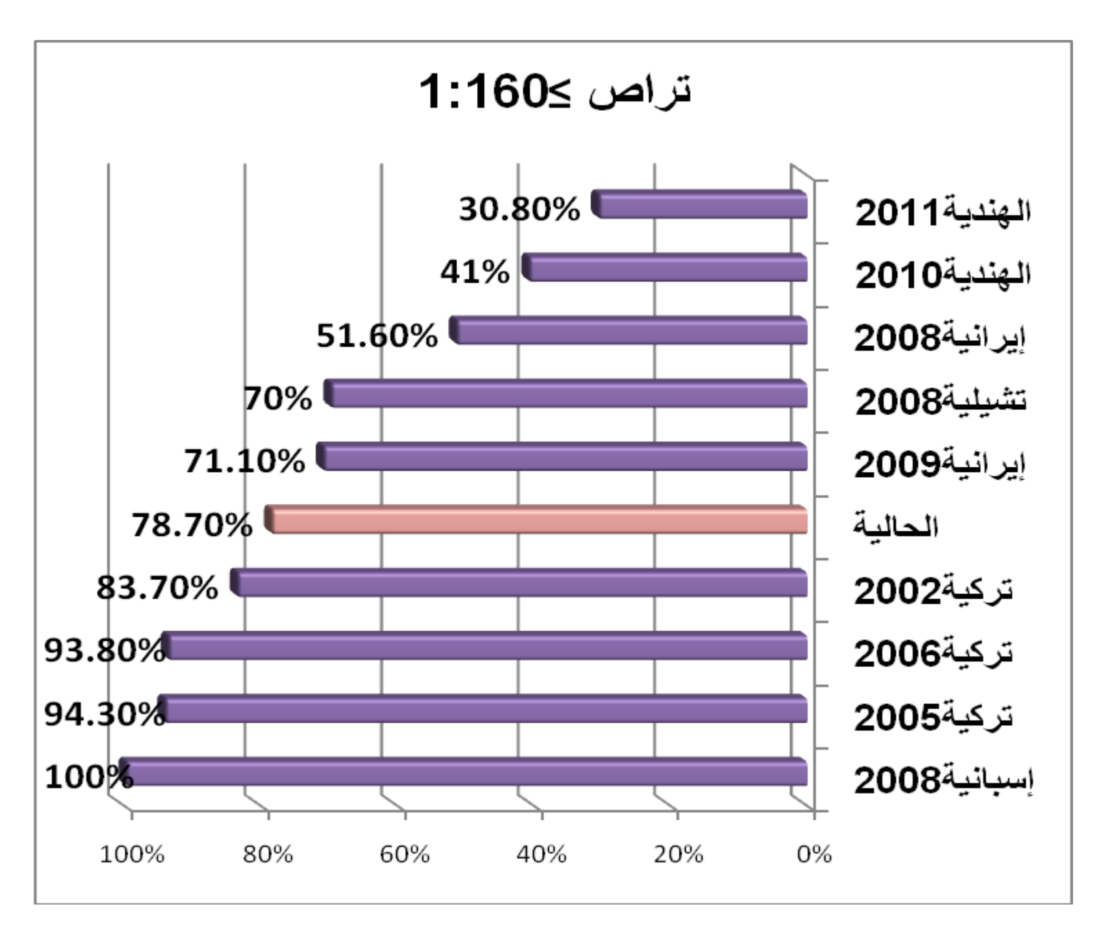


الشكل رقم (14)

نلاحظ من المخطط السابق أنّ نسبة إيجابية الإليزا IgM في هذه الدراسة متوافقة مع الدراسة التركية **2006** والهندية 2011 ومرتفعة مقارنة مع باقي الدراسات. وقد يعود سبب الاختلاف بين الدراسات إلى اختلاف الطرق المستخدمة بين الدول أو إلى اختلاف مرحلة المرض في الدراسات.

وقد كانت نسبة إيجابية الإليزا في مرضى هذه الدراسة مرتفعة 95.5% وقد توافقت في ذلك تقريباً مع الدراسة الهندية 2011 والهندية 2010 و الإيرانية 2008 والتي كانت الإليزا فيها إيجابية في جميع المرضى المُشَخَّصين(100%).

2-4- نسبة إيجابية التراصّ ≤ 1:160: لوحظ أنّ أعلى نسبة في اختبار التراصّ كانت في الدراسة الإسبانية 2008 بنسبة 100% بينما كانت أخفض نسبة للتراص في الدراسة الهندية 2011 بنسبة 30.8% ، والمخطط التالي رقم (15) يوضح ذلك:



الشكل رقم (15)

نلاحظ من المخطط السابق أنّ نسبة إيجابية اختبار التراص ≤ 1:160 في هذه الدراسة متوافقة مع الدراسة التركية 2002 والتشيلية 2008 والإيرانية 2009 ، بينما كانت مرتفعة مقارنة مع الدراسة الإيرانية 2008 والهندية 2010 والهندية 2011 وكانت منخفضة مقارنة بالدراسات التركية 2002 و التركية 2006 و2005 والإسبانية 2008. وقد يعود سبب اختلاف نسب التراص الإيجابي بين الدراسات إلى اختلاف الطرق المستخدمة بين الدول، أو إلى أنّ اختبارات التراصّ تُعدُّ محدّدة بشكل كبير بسبب الارتفاع غير المقبول في حالات السلبية الكاذبة العائدة إلى أحد هذه العوامل (نوع المستضدّ، والاختبار المستخدم، وظاهرة البروزون، وصنف الأضداد المسيطرة، ومرحلة المرض) أو إلى عاملين أو أكثر منها.

وعلى الرغم من اختلاف نسب الإيجابية في اختباري الإليزا والتراصّ بين هذه الدراسة والدراسات الأخرى فقد توافقت هذه الدراسة مع الدراسات: الهندية 2011 والهندية 2010 والإيرانية 2008 والإيرانية.2009 والتشيلية 2008 والتركية 2006 في أنَّ الإليزا هي الاختبار الأكثر مصداقية وحساسيّة مقارنة بالتراصّ في تشخيص مرض الحمّى المتموّجة، بينما وجدنا أنّ هذه الدراسة اختلفت مع الدراسة الإسبانية 2008 والتركية 2005 والتركية 2002 في أنّ التراصّ هو الاختبار الأكثر حساسية مقارنة مع الإليزا في تشخيص مرض الحمّى المتموّجة، ولكنها اتفقت معها على أنَّ التراص يُفَضّل على الإليزا في تشخيص المرض الحاد لأنه أقل تكلفة وأسهل استخداماً. مع العلم أنَّ اختبار التراص المستخدم في الدراسات هو التراص في الأنبوب والتراص المستخدم في الدراسة الحالية هو التراص على شريحة.

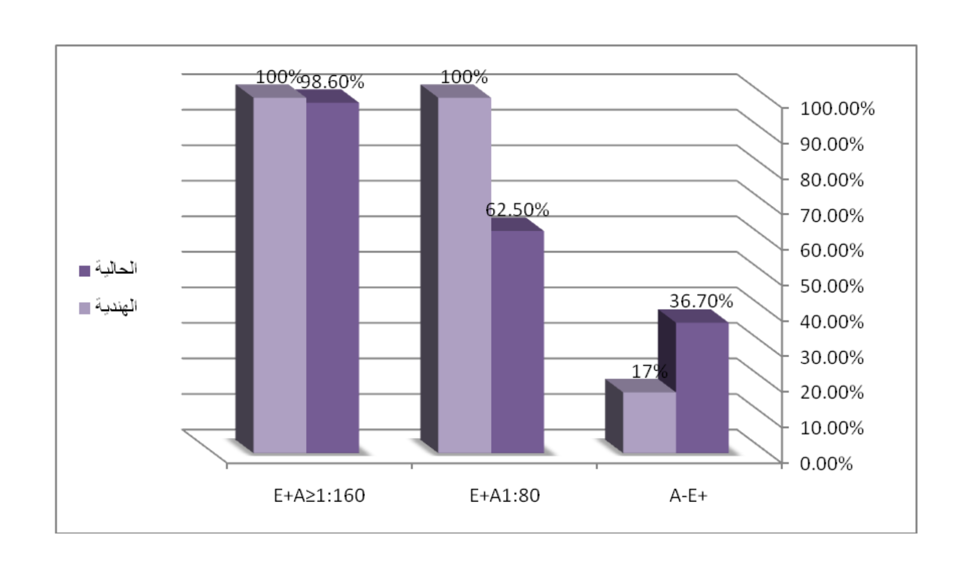
2-5- علاقة اختبار التراصّ مع الإليزا في الدراسة الحالية والدراسة الهنديـــة 2011: إنّ الجدول رقم (13) يوضّح العلاقة بين اختبار التراصّ والإليزا في مرضى الدراسة الهندية(73) الذين يبلغ عددهم 42 مريضاً:

عيارات اختبار التراصّ في الأنبوب	عدد المرضى	الإليزا إيجابية IgM وIgG	النسبة المئوية للإليزا
سلبي	35	6	%17.1
1:80	3	3	%100
1:160 ≤	4	4	%100

الجدول رقم (13)

وبالمقارنة مع الجدول الذي يوضح العلاقة بين اختبار التراصّ والإليزا في مرضى الدراسة الحالية:

عيارات اختبار التراصّ على شريحة	عدد المرضى	الإليزا إيجابية IgM و IgG	النسبة المئوية للإليزا
سلبي	30	11	%36.7
1:80	8	5	%62.5
1:160 ≤	70	69	%98.6



الشكل رقم (16) يوضح العلاقة بين اختبار التراصّ و الإليزا في عينة الدراسة الحالية و الهندية

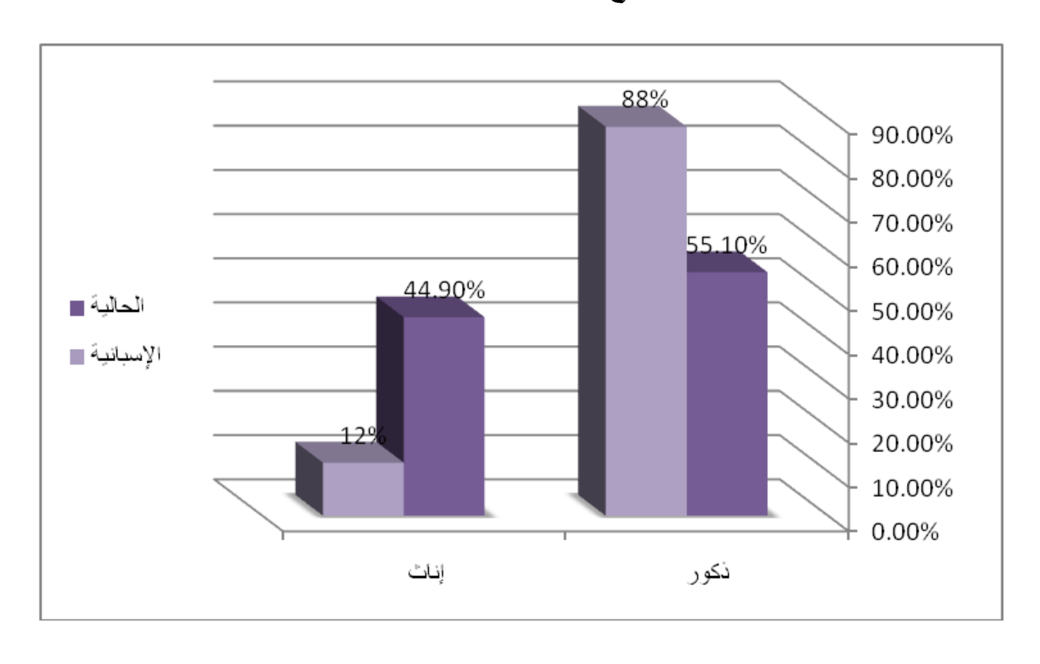
نلاحظ من المخطط توافق الدراستين من حيث ارتفاع النسبة الإيجابية للإليزا في المرضى الذين يملكون العيار ≤ 1:160، واختلاف هذه الدراسة مع الدراسة الهندية في نسبة إيجابية الإليزا مع المرضى الذين يملكون العيار 1:80 وقد يعود السبب إلى انخفاض عدد مرضى الدراسة الهندية الذين يمتلكون العيار 1:80 مقارنة بهذه الدراسة.

وقد أُجرِي اختبار كاي مربع x^2 لتحليل البيانات لبيان وجود علاقة بين نتائج اختبار الإليزا و نتائج اختبار التراص في كل دراسة على حدة، فكانت قيمة p=0.001 (< 0.05) أي أنه يوجد ارتباط إحصائي مهمّ بين نتائج الإليزا والتراص ولا سيما العيارات ≤ 1:160 مما يجعل هذا العيار ذو دلالة واضحة وهامة على المرض لترافقه مع إيجابية الإليزا بنسبة 98.6% في هذه الدراسة وبنسبة 100% في الدراسة الهندية.

2-6-مقارنة الدراسة الحالية مع الدراسة الإسبانية من حيث عمر وجنس المرضى: كـــان التركيب الجنسي في هذه الدراسة يتألّف من (49) ذكراً و(40) أنثى، بينما كانت أعمـــار المرضـــى تتراوح ما بين (2) سنتين و(70) سنة. وكان متوسط عمر المرضى في هذه الدراســـة (17) عامـــاً وكانت الأعمار ما بين(2) سنتين و(15)سنة هي التي تمثل النسبة الأكبر بين المرضـــى (43.8%)، بينما كانت الأعمار ما بين (30) سنة و(39) سنة تمثّل ما نســـبته (36%). وبالمقارنـــة بالدراســـة الإسبانية كان عدد الذكور(22) وعدد الإناث (3)، وكانت أعمار المرضى تتراوح ما بين (12) ســـنة و(80) سنة، وكان متوسط عمر المرضى (41)عاماً، وكان العقد الثالث هو العمـــر المســـيطر فـــي الدراسة الإسبانية.

وبمقارنة النتائج بين الدراسة الحالية والإسبانية وجدتُ أنّ عدد الذكور في كـــلا الدراســـتين أكبر من عدد الإناث، بينما كان العقد الثالث هو المسيطر في الدراسة الإســـبانية؛ إذ شـــكّلَ الأطفـــالُ أغلبيةَ المرضى في هذه الدراسة.

وسبب اختلاف العمر وشيوع إصابة الأطفال في بلادنا قد يكون عائداً إلـــى ســـوء العنايـــة الصحية، وعدم الاهتمام بمصدر الغذاء الذي يتناوله الصغار من مثلجات وأجبـــان وحليـــب، والـــذي يكون سيئ المعالجة غالباً في كثير من المناطق في بلادنا، إضافة إلى أن بلادنا من البلاد الفتية التـــي يشكل فيها الأطفال نسبة كبيرة من المجتمع.



الشكل رقم (17) يوضح توزع المرضى وفق الجنس في الدراسة الحالية والإسبانية

وأخيراً ما يزال من الصعب جدّاً تأويل الموجودات المخبريّة المصلية في مرض الحمّى المتموّجة لعدة أسباب، هي **(76):**

1- لم تُعرف حتى الآن كيفيّة القضاء الكامل على البروسيلا داخل الخلوية.

2- لا يوجد معيّار دقيق للشفاء الكامل من هذا المرض

3- تعرُّضُ جزءٍ كبير من سكان المناطق الموبوءة بالمرض كبلادنا إلى التماس مع الحيوانات المخموجة أو منتجاتها وتطوير الأضداد النوعية للبروسيلا عند العديد منهم.

التوصيات

1)- الإليزا أكثر حساسية مقارنة بالتراصّ على شريحة، ولكنْ يُفضّلُ التراصّ على الإليزا في تشخيص مرض الحمّى المتموّجة الحاد؛ لأنّه أقلُّ تكلفةً، وأسهلُ استخداماً.

2)- يُنصَح بالإليزا في تأكيد حالات الشكّ السريري بالحمّى المتموّجة عندما يكون اختبار التراصّ سلبياً، أو عندما يغيب الارتفاع في عيار الأضداد بعد أسبوعين.

3)- يُعَدُّ الجمع بين الإليزا IgM و الإليزا IgG أكثر فعّاليّة في كشف مرض الحمّى المتموّجة.

4)- يمتلك العيار $\leq$ 1:160 القيمة التشخيصية المهمة والواضحة للمرض الفعّال طالما يعاني المريض من أعراض وعلامات الحمى المتموجة.

5)- لا تُؤخذُ نتائجُ الاختبارات المصلية بمعزلٍ عن الموجودات السريرية.

6)- ينبغي إعادة اختبار التراصّ على شريحة بعد أسبوعين من أجل التحري عن ارتفاع عيار الأضداد أربعة أضعاف أو أكثر، وقد لا يظهر ارتفاعُ عيار الأضداد عند المرضى في بلادنا بعد أسبوعين على الرغم من فعّاليّة المرض، بسبب شيوع المرض عندنا، لذلك سيكون من المهمّ جدّاً أنْ نعرف أنواع الأضداد وأنّ نُحدّدَ مرحلةَ المرض بطريقة الإليزا

7)- يجب متابعة المرضى مدّةَ سنة للتأكد من عدم نكس المرض، وذلك بقياس أضداد IgG بعد ثلاثة أشهر من العلاج باستخدام اختبار الـــ2-مركابتو إيتانول للتأكد من عدم ارتفاع عيار الأضداد أو للتأكد من عودة مستوى الأضداد لوضعه الطبيعي (سلبية اختبار الـــ2- مركابتو إيتانول تنفي إزمان المرض).

8)- يجب نشر الوعي الصحي بين مختلف طبقات المجتمع والتأكيد على ضرورة غلي الحليب والأجبان وعدم تناول لحوم الحيوانات المصابة وعدم سقاية المزروعات بمياه ملوثة بمفرزات حيوانات مصابة لمنع ازدياد حالات الإصابة في المجتمع وخصوصاً بين الأطفال، إضافةً إلى التأكيد على ضرورة تلقيح الحيوانات الأهلية؛ لأنّ سورية تتصدر دول العالم في عدد حالات الإصابة بالحمّى المتموّجة.

الخلاصة

الملخص: تُعَدُّ الحمّى المتموّجة من أكثر الأمراض المشتركة انتشاراً في العالم، مع درجة مرتفعة من الإمراضية في الإنسان.

وبسبب غياب نوعية الصورة السريرية لهذا المرض يتطلّبُ التشخيصُ الأكيد له عزلَ العاملِ الممرض أو تأكيدَ الارتفاعِ في عيارات الأضداد النوعية أو حدوثَ الانقلابِ المصلي.

الهدف: تحليل القيمة التشخيصية للمقايسة المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا IgG و IgM) لدى المرضى المشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموّجة، وتحرّي العلاقة بينها وبين اختبار التراصّ على الشريحة (باستخدام البروسيلا المالطية M و البروسيلا المجهضة A).

طرق العمل: تمت الدراسة بين شهري نيسان وأيلول من عام (2010) حيث أُجْرِيَ اختبارُ التراصّ على الشريحة، وأُجْرِيَ اختبارُ المقايسة المناعية بالربط بالإنزيم (الإليزا) على(108) مرضى مشكوك بإصابتهم بالحمّى المتموّجة، وتمَّ كشف المرض وتشخيصه عند (89) منهم، وكان التركيب الجنسي للمرضى مؤلفاً من (49) ذكراً و(40) أنثى، وكانت أعمارهم ما بين الــ (2) سنتين و(70) سنة و كان متوسط أعمارهم (17.6±24.38) سنة.

وقد وُضِعَ التشخيصُ عند المرضى على أساس وجود المظاهر السريريّة والنتائج الإيجابية للاختبار المصلي: اختبارِ (الإليزا غير المباشرة) أو اختبارِ(التراصّ على شريحة ≤ 1:80) .أو كليهما معاً.

النتائج: كان التراصّ إيجابياً ≤ 1:160 بنسبة 78.7%، التراصّ إيجابياً ≤ 1:80 بنسبة 87.6%، الإليزا IgM إيجابية بنسبة 88.8%، الإليزا IgG إيجابية بنسبة 75.3%.

وكان بين مرضى الحمّى المتموّجة (78) مريضاً إيجابيَّ التراصّ ≤ 1:80، وكان التراصّ سلبياً < 1:80 والإليزا إيجابية عند (11) مريضاً، التراصّ إيجابياً ≤ 1:80 والإليزا سلبية عند (4) مرضى، وهذا يعني أنّ الإليزا أكثر حساسية مقارنة باختبار التراصّ.

بسبب تأكيد التشخيص بالإليزا تبيّن أنّ الحالات الــ(11) التي أظهرت تراصاً سلبياً < 1:80 لا يمكن استبعادها من التشخيص

ومن أجل تحديد القيمة التشخيصية للإليزا قمتُ بمقارنة الحساسية بينها وبين التراصّ على الشريحة: التراصّ على الشريحة ≤ 1:160: 78.7%، التراصّ ≤ 1:80: 78.7%، الإليزا IgM: 88.8%، الإليزا IgG: 75.3%.

الخاتمة: أظهرت هذه الدراسة أنَّ الإليزا هي الاختبار السريع والحساس، والذي يزودنا بأصناف الغلوبيولينات النوعية، ويُمكّننا من التشخيص الدقيق للحمّى المتموّجة، ولكنْ يُفضّلُ اختبار التراصّ على شريحة في تشخيص مرض الحمّى المتموّجة الحاد [كانت الإليزا IgM إيجابية في (92.9%) من الحالات إيجابية التراصّ ≤ 1:160]؛ كما أنّه أقلُّ تكلفةً، وأسهلُ استخداماً.
يمتلك عيار التراصّ ≤ 1:160 دلالة واضحة ومهمة على المرض الفعّال طالما يترافق مع أعراض و علامات المرض [89.7% من المرضى الذين يعانون من أعراض وعلامات الحمى المتموجة كانوا يملكون العيار ≤ 1:160].

.

SUMMARY

Ab s t r a c t: Brucellosis is a worldwide zoonosis with a high degree of morbidity in humans.
As the clinical picture of human brucellosis is fairly non-specific, a definitive diagnosis requires isolation of the causative organism, or the demonstration of the high levels of specific antibodies, or seroconversion.

Aim: To analyse the diagnostic value of the immunoenzymatic test (ELISA IgM and IgG) in patients with suspected brucellosis, and to examine the relationship between ELISA and slide agglutination test (with Brucella melitensis (M), B. abortus (A)).

Methods: We analysed the diagnostic methods in 108 suspected brucellosis patients; 49 were male and 40 were female, and their ages ranged from 2 to 70 years (median, 24.38±17.6 years) at Aleppo University Hospital from April to September 2010.
The disease was diagnosed by clinical findings and on positive relevant serologic test results (ELISA or /and slide agglutination test ≥1:80).

Results:. The slide agglutination test ≥1:180 was positive in 78 patients – 78/89 (87.6%).Brucella IgM antibodies with ELISA were positive in 79/89 (88.8%), Brucella IgG antibodies with ELISA were positive in 67/89 (75.3%).
Among 89 patients: 78(87.6%) cases were positive in agglutination ≥1: 80, 85(95.5%) cases were positive in ELISA, 11 cases revealed negative titers with slide agglutination test < 1:80 while a variety of positive titers have been recorded with IgM and IgG ELISA, 4 cases were positive with agglutination test (≥1:80) but negative with IgM and IgG.
Because they were confirmed by ELISA, the diagnosis could never be excluded with Slide agglutination test in 11 cases.
In order to determine the diagnostic value of the ELISA, we compared the sensitivity between the test-methods: slide agglutination test ≥1:160 (78.7%), slide agglutination test ≥1:80 (87.6%), ELISA IgM(88.8%), and ELISA IgG(75.3%).

Conclusion: This study showed that brucella ELISA is a rapid, and sensitive assay, provides a profile of Ig classes in the diagnosis of brucellosis.
However; agglutination test ≥ 1:160 may be preferred to ELISA in diagnosis acute brucellosis [ELISA IgM was positive in %92.9 cases with agglutination titer ≥ 1:160] and because it is cheap and easily applicable.
Although titres of 1:160 or more have a clear and signeficant diagnostic value as long as the patient presents signs and symptoms of the disease [89.7% of patients with symptoms and signs of brucellosis have a titre ≥ 1:160].

المراجع العربية والأجنبية

1- عبيد ميخائيل، علم الجراثيم،مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية بدمشق كلية الصيدلة، جامعة دمشق، 1997 .

2- بلاش عمر، علم الجراثيم-الجزء النظري، مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية بحلب، كلية الطب البشري، جامعة حلب،2009.

3.Rubio, M., B. Barrio, and R. Díaz.. Usefulness of Rose Bengal,Coombs and counter-immunoelectrophoresis for the diagnosis of human brucellosis cases with negative seroagglutination. Enferm. Infecc. 2001; 19:406-407.

4.Gad El-Rab, M. G., and A. M. Kambal. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. Appleton & Lange 1998; 36:197-201.

5.MIMS, Medical Microbiology . AJNR Am J Neuroradiol .1993.

6.Wilkinson, and Lise Brucellosis. Lippincott Williams & Wilkins 1993.

7.Malhotra, Ravi. Practical Neurology. Enferm. Infecc. 2004;4: 184–5.

8.Al-Sous MW, Bohlega S, et al.Neurobrucellosis: clinical and neuroimaging correlation. . Lancet Infect Dis. 2004;25 : 395–401.

9. Bruce D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. Practitioner 1887;39:161-70.

10.Hughes ML. Mediterranean, Malta or undulant fever. Macmillan: London; 1887.

11. Wright AE, Smith F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid fever and Malta fever. Lancet 1897;1:656-9.

12. Zammit T. Report of the Commission on Mediterranean Fever, part III. Harrison and Sons: London; 1905.

13. Lucero NE, Escobar GI, et al. Diagnosis of human brucellosis caused by Brucella canis. J Med Microbiol 2005;54:457-61.

14. Brew SD, Perrett LL,et al Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal. Vet Rec 1999;144:483.

15. Sohn AH, Probert WS, et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp. Emerg Infect Dis 2003;9:485-8.

16. Pappas G, Papadimitriou P, et al. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2006;6:91-9.

17. Verger JM, Grimont F, et al. Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1985;35 :292-5.

18. Al Dahouk S, Tomaso H, et al. Laboratory based diagnosis of brucellosis.Techniques for direct detection and identification of Brucella spp. Clin Lab 2003;49:487-505.

19. Perry MB, Bundle DR. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of Brucella. . Lippincott Williams & Wilkins. 1990.
20. Corbel MJ. The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from Brucella abortus. . J Hyg (Lond) 1976;76:65-74.
21. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. . Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:443-8.
22. Sanchez DO, Zandomeni RO, Cravero S, Verdun RE, Pierrou E, Faccio P, et al. Gene discovery through genomic sequencing of Brucella abortus. Infect Immun 2001;69:865-8.
23. Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, et al. The Brucella suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:13148-53.
24. Ficht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden SW. Species-specific sequences at the omp2 locus of Brucella type strains. Infect Immun 1996;46:329-31.
25. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of Brucella. Microbiology. 1995;141:2111-21.
26. Michaux S, Paillisson J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A, Ramuz M. Presence of two independent chromosomes in the Brucella melitensis 16M genome. . J Bacteriol 1993;175:701-5.
27. Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: A worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 2001; 4 :58-64.
28. WHO. The development of new improved brucellosis vaccine. Joint FAO/WHO expert committee. 1997.
29. Amato Gauci AJ. The return of brucellosis. *Maltese Med J* 1995;7:7-8.
30.Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Sixth Report. World Health Organ Tech Rep Ser No. 740. World Health Organization: Geneva; 1986.

31. Almuneef MA, Memish ZA, et al. Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. Epidemiol Infect 2004; 132 :533-40.
32. Mantur BG, Biradar MS, et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. J Med Microbiol 2006; 55 :897-903.
33. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, et al. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp. Emerg Infect Dis 2003;9:485-8
34. McDonald WL, Jamaludin R, et al. Characterization of a Brucella sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal

osteomyelitis in New Zealand. J Clin Microbiol 2006;44: 4 363-70.
35. Mantur BG, Mangalgi SS, Mulimani M. Brucella melitensis: A sexually transmissible agent . Lancet 1996;347:1763.
36. Paton NI, Teu NW, Vu CF, Teo TP. Brucellosis due to blood transfusion. Clin Infect Dis. 2001;32:1248.
37. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. Brucellosis in a mother and her young infant: Probable transmission by breast milk. . Int J Infect Dis 2000;4:55-6.
38. Eckman MR. Brucellosis linked to Mexican cheese. JAMA 1975;232:636-7.
39. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis: A review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp. Clin Lab 2003;49:487-505.
40. Arlett PR. A case of laboratory acquired brucellosis. BMJ 1996;313:1130-2.
41 Noviello S, Gallo R, et al. Laboratory-acquired brucellosis. . Emerg Infect Dis 2004;10:1848-50.
42. Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to Brucellae and implications for bioterrorism. Emerg Infect Dis 2005;11:1180-5.
43. Corbel MJ. brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7
44. Dubray G. Protective antigens in brucellosis. Ann Inst Pasteur Microbiol 1987;138:84-7.
45. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of Brucella reactive CD4 + T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995 ;63:969-75.
46. Caron E, Peyrard T, et al. Live Brucella spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes . . Infect Immun 1994;62:5267-74.
47. Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by Brucella abortus and their role in the intracellular survival of the bacteria. J Infect Dis 1986;154:464-70.
48. Jubier-Maurin V, et al. Major outer membrane protein Omp25 of Brucella suis is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages Infect Immun 2001;69:4823-30.
49. Cloeckaert A, Vizcaino N, et al. Major outer membrane proteins of Brucella spp: Past, present and future. Vet Microbiol 2002; 90 :229-47.
50. Pizarro-Cerda J, Moreno E, et al. Virulent Brucella abortus prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. Infect Immun 1998; 66 :2387-92.
51. Dokuzoguz B, Ergonul O, Baykam N, Esener H, Kilic S, Celikbas A, et al. Characteristics of B. melitensis versus B. aborus bacteraemias. J Infect 2005; 50 :41-5.
52. Mantur BG, Akki AS, Mangalgi SS, Patil SV, Gobbur RH, Peerapur BV. Childhood brucellosis - a microbiological, epidemiological and clinical

study. J Trop Pediatr 2004; 50 :1537.
53. Bodur H, Balaban N et al. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of Brucella isolates. Scand J Infect Dis 2003; 35 :337-8.
54. Malik GM. A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia. Am J Trop Med Hyg 1997;56:375-7.
55. Pappas G, Akritidis N,et al. Brucellosis. N Engl J Med 2005; 352:2325-36.
56. Shehabi A, Shakir K, el-Khateeb M, Qubain H, Fararjeh N, Shamat AR. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. . J Infect 1990; 20 :5-10.
57. Buchanan TM, Faber LC, Feldman RA. Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part I. Clinical features and therapy. Medicine (Baltimore) 1974; 53 :403-13.
58. Bingol A, Togay-Isikay C. Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks. Eur J Neurol 2006; 13 :5448.
59. Young EJ. Human brucellosis. Rev Infect Dis 1983; 5:821-42.
60. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995;21:283-290.
61. Mousa AR, Muhtaseb SA, Almudallal DS, Khodeir SM, Marafie AA. Osteoarticular complications of brucellosis: A study of 169 cases Rev Infect Dis 1987; 9 :531-43.
62. Mantur BG, Mulimani MS, et al. Brucellar epididymoorchitis- report of five cases. Indian J Med Microbiol. J Med Microbiol 2001; 19 :208-11.
63. Kocak I, Dundar M, Culhaci N, Unsal A. Relapse of brucellosis simulating testis tumor Int J Urol. 2004; 11::683-5.
64. Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, MartinezAlfaro E, Atienzar M, et al. Epididymoorchitis due to Brucella melitensis: A retrospective study of 59 patients. Clin Infect Dis 2001; 33 :2017-22.
65. Tsolia M, Drakonaki S, et al. Clinical features, complications and treatment outcome of childhood brucellosis in central Greece. J Infect 2002; 44 :257-62.
66. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. Drugs 1997; 53 :245-56.
67. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez-De-Mora D, Delgado M, Causse M, et al. Complications associated with Brucella melitensis infection: A study of 530 cases. Medicine (Baltimore) 1996;75:195-211.
68. Mantur BG, Mangalgi SS. Evaluation of conventional Castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis. J Trop Pediatr .2004; 42 :4327-8.
69. Magill GB, Killough JH, Said SI. Cortisone and combined antibiotic therapy of acute brucellosis melitensis. Am J Med 1954; 16 :810-7.
70. Iseri S, Bulut C, Yetkin MA, Kinikli S, Demiroz AP, Tulek N. Comparison of the diagnostic value of blood and bone marrow cultures in brucellosis. Mikrobiyol Bul 2006; 40 :201-6 .
71. Al-Shamahy HA, Wright SG. Enzyme-linked immunosorbent assay for Brucella antigen detection in human sera. J Med Microbiol 1998; 47 :169-

72.
72. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, et al. Rapid diagnosis of Brucella epididymo-orchitis by real time polymerase chain reaction assay in urine samples. J Urol 2006; 176 :2290-3.
73. Probert WS, Schrader KN, et al. Real-time multiplex PCR assay for detection of Brucella spp, B. abortus and B.melitensis. J Clin Microbiol 2004; 42 :12903.
74. Gee JE, De BK, et al. Use of 16S r RNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of Brucella isolates. J Clin Microbiol 2004; 42 :3649-54.
75. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. . Expert Rev Mol Diagn .2004; 4 :115-23.
76. Lucero NE, Escobar GI, et al. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. J Med Microbiol 2003; 52 :883-7.
77. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez Jet al. Rose Bengal test: Diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect 2005; 11 :221-5.
78. Kiel FW, Khan MY. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia. J Clin Microbiol 1987; 25 :1384-7.
79. Smits HL, Kadri SM. Brucellosis in India: A deceptive infectious disease. Indian J Med Res 2005; 122 :375-84.
80. Buchanan TM, Faber LC. 2-mercaptoethanol Brucella agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. J Clin Microbiol 1980; 11 :691-3.
81. Almuneef M, Memish ZA. Persistence of Brucella antibodies after successful treatment of acute brucellosis in an area of endemicity. J Clin Microbiol 2002; 40 :2313.
82. Orduna A, Almaraz A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 2000; 38 :4000-5.
83. Almuneef M, Memish ZA. Prevalence of Brucella antibodies after acute brucellosis. J Chemother 2003; 15 :148-51.
84. McLean DR, Russell N, Khan MY. Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. . Clin Infect Dis 1992; 15 :582-90.
85. Casao MA, Smits HL, Navarro E, Solera J. Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: Correlation with the period of evolution of the disease. Clin Microbiol Infect 2003; 9 :301-5.
86. Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. . Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10 :1141-6.
87. Abdoel TH, Smits HL. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57 :123-8.
88. Radolf JD. Southwestern Internal Medicine Conference: Brucellosis: Don't let it get your goat. Am J Med Sci 1994; 307 :64-75.
89. Hall WH. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. Rev Infect Dis

1990; 12 :1060-99.

90. Ariza J, Gudiol F, et al. Comparative trial of rifampin-doxycycline versus tetracyclinestreptomycin in the therapy of human brucellosis. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28 :548-51.
91. Karabay O, Sencan I, et al. Ofloxacin plus rifampicin versus doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: A randomized clinical trial BMC Infect Dis.2004; 4 :18.
92. Pappas G, Christou L, et al. Quinolones for brucellosis: Treating old diseases with new drugs. Clin Microbiol Infect 2006; 12 :823-5.
93. Nicoletti P. Control, eradication and prevention. In: Madkour MM, editor. Madkour's brucellosis. Springer: New York; 2001.
94. Busch LA, Parker RL. Brucellosis in the United States. . J Infect Dis 1972; 125 :289-94.

95.Sathyanarayan MS, Suresh Dr , et al. A comparative study of agglutination tests, blood culture & ELISA in the laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Biol Med Res. 2011; 2: 569-572.

96.Basappa Mantur, Aisha Parande, et al. ELISA versus Conventional Methods of Diagnosing Endemic Brucellosis. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010;83: 314-318.

97.Ravikumar RAmirzargar, Hassibi, et al. Comparison of Diagnostic Methods in Hospitalized Patients With Brucellosis in Iran. Infectious Diseases in Clinical Practice. 2009; 17 :239-242.

98.M. Concepcio´n Go´mez, Jose´ A. Nieto, et al. Evaluation of Seven Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in an Area Where the Disease Is Endemic. Clinical and Vaccine Immunology. 2008;7: 1031–1033.

99.Farzad Heydari, Noor Amir Mozaffari , Amir Tukmechi.Comparison of Standard Seroagglutination Test and ELISA for Diagnosis of Brucellosis in West Azerbaijan Province, Iran. Research Journal of Biological Sciences.2008; 3:1460-1462.

100.Aranís J C, Oporto C J, et al. Usefulness of the determination of IgG and IgM antibodies by ELISA and immunocapture in a clinical series of human brucellosis. Rev Chilena Infectol. 2008; 25:116-21.

101.Mustafa ERTEK1, Halil YAZGI2, et al. Comparison of the Diagnostic Value of the Standard Tube Agglutination Test and the ELISA IgG and IgM in Patients with Brucellosis. Turk J Med Sci. 2006; 36: 159-163.

102.Ciftçi C, Oztürk F, et al.Comparison of the serological tests used for the laboratory diagnosis of brucellosis. Mikrobiyol Bul. 2005;39:291-9.

103.Sirmatel F, Türker M, Bozkurt AI. Evaluation of the methods used for the serologic diagnosis OF brucellosis. Mikrobiyol Bul. 2002;36:161-7.

104.Jerry B. Gaultney, Reuben D. Wende, Robert P. Williams. Microagglutination Procedures for Febrile Agglutination Tests Applied Microbiology. 1971;12:635-640

105.Yahya Faydi , Suleiman AL-khalil. Laboratory Diagnosis of Brucellosis Using the Slide and Standard Tube Agglutination Methods . Am J Med Sci. 1992 ;15:55-61 .

ALEPPO UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF LABORATORY MEDICINE

SECTION OF MICROBIOLOGY



Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis

THESIS FOR MASTER DEGREE IN MICROBIOLOGY

Submitted

Dr. HALA ESLEEM

Certification

It is herby certified this work described in this thesis is the result of the candidate s own investigation under the supervision of Dr. O. Balach & Dr. SH.Alfares in the department of laboratory medicine, faculty of medicine, Aleppo University.

Candidate	**Supervisors**	
Dr. H. ESLEEM	**Dr. Shaker AL Faress**	**Dr. Omar Balach**

Declaration

It is hereby I declare that this work " Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis.

" has not already been accepted for any degree, nor it is being submitted at present for any other degree.

Candidate

Dr. H.ESLEEM

ALEPPO UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF LABORATORY MEDICINE

SECTION OF MICROBIOLOGY



Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis

THESIS FOR MASTER DEGREE IN MICROBIOLOGY

Submitted

Dr. HALA ESLEEM

Supervised by

Dr. SHAKER AL FARESS
Lecturer in the Department
Of laboratory medicine
Facultyt of medicine
Aleppo University

Dr. OMAR BALACH
Professor in the Department
Of laboratory medicine
Facultyt of medicine
Aleppo University

" Submitted in partial fulfillment of requirements for master degree in Microbiology at the faculty of Medicine, University of Aleppo".

ALEPPO UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE

DEPARTMENT OF LABORATORY MEDICINE

SECTION OF MICROBIOLOGY



Evaluation of the Brucella immunoglobulin IgG and IgM Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) for diagnosis of Human Brucellosis

THESIS FOR MASTER DEGREE IN MICROBIOLOGY

Submitted

Dr. HALA ESLEEM

Supervised by

Dr. SHAKER AL FARESS
Lecturer in the Department
Of laboratory medicine
Facultyt of medicine
Aleppo University

Dr. OMAR BALACH
Professor in the Department
Of laboratory medicine
Facultyt of medicine
Aleppo University